

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

Annona emarginata (SCHLTDL.) H. RAINER ‘ARATICUM-DE-
TERRA-FRIA’ CULTIVADA COM VARIAÇÃO DE NITROGÊNIO:
PRODUTIVIDADE E PERFIL QUÍMICO DOS VOLÁTEIS
FOLIARES

FELIPE GIROTTTO CAMPOS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU - SP

Julho – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

Annona emarginata (SCHLTDL.) H. RAINER ‘ARATICUM-DE-
TERRA-FRIA’ CULTIVADA COM VARIAÇÃO DE NITROGÊNIO:
PRODUTIVIDADE E PERFIL QUÍMICO DOS VOLÁTEIS
FOLIARES

FELIPE GIROTTO CAMPOS

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fernandes Boaro

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU – SP

Julho – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C198a Campos, Felipe Giroto, 1989-
Annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer 'araticum-de-terra-fria' cultivada com variação de nitrogênio: produtividade e perfil químico dos voláteis foliares / Felipe Giroto Campos. - Botucatu : [s.n.], 2014
ix, 83 f. : fots. color., grafs., ils. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014
Orientador: Carmen Sílvia Fernandes Boaro
Inclui bibliografia

1. Anonaceas. 2. Plantas - Transpiração. 3. Terpenos. 4. Nitrogênio. I. Boaro, Carmen Sílvia Fernandes. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER ‘ARATICUM-DE-TERRA-FRIA’ CULTIVADA COM VARIAÇÃO DE NITROGÊNIO: PRODUTIVIDADE E PERFIL QUÍMICO DOS VOLÁTEIS FOLIARES

ALUNO: FELIPE GIROTTO CAMPOS

ORIENTADOR: PROFa DRa CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO

Aprovado pela Comissão Examinadora



Profª Dra CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO



Profª Dra GISELA FERREIRA



Prof. Dr. IVAN DE LA CRUZ CHACÓN

Data da Realização: 31 de julho de 2014.

Dedico

*À minha mãe Maria de
Fatima Giroto, ao meu irmão
Breno Giroto Campos e aos meus
avós maternos pelo apoio,
incentivo e compreensão pelas
inúmeras vezes que minha
dedicação ao trabalho os
fizeram esperar.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela luz, inspiração e determinação para a realização deste estudo.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas e ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À professora doutora Carmen Sílvia Fernandes Boaro pela orientação, paciência e amizade construída ao longo dos anos e por ter confiado e acreditado em mim para a realização deste trabalho.

À professora doutora Gisela Ferreira, cujo fascínio pelas Annonaceas me contagiou.

À professora doutora Márcia Ortiz Mayo Marques por disponibilizar seu laboratório para a realização de análises de óleo essencial e estar sempre disponível para auxiliar.

À professora doutora Martha Maria Mischon, pela auxílio nas análises estatísticas.

À professora doutora Conceição Aparecida Cossa, pela confiança e a Maria Aparecida Fonseca Sorace, pessoas que me incentivaram a ingressar no mundo científico e realizar esse sonho.

Aos meus amigos de Departamento e vida, Amanda Cristina Esteves Amaro e Daniel Baron, pelo apoio incondicional, inclusive colaborando com a execução da parte experimental.

Aos meus amigos Renato de Oliveira Neves, Raquel Rodrigues e Mary Elisa Araújo de Oliveira, PIBIC Jr, pelo auxílio durante a execução desse trabalho.

À minha mãe, Maria de Fátima Giroto, exemplo de força, superação e fonte de inspiração, pelo apoio, incentivo e compreensão incontestáveis.

Ao meu irmão, Breno Giroto Campos, por estar sempre do meu lado e por ser também minha fonte de inspiração e determinação.

Aos meus avós maternos que sempre me apoiaram.

Aos meus tios, Daniel Antônio Giroto, de onde retiro todos os exemplos paternos, Luís A. Giroto e Luzia Aparecida Giroto, que sempre creditaram em mim.

Aos meus primos Elizabete Antônia Giroto, Maria Clara Giroto de Faria e Walter de Faria pelo total apoio.

Muito obrigado!

“A força não provém da capacidade física. Provém de uma vontade indomável.”

(Mahatma Gandhi)

“Existem dois dias no ano em que não podemos fazer nada: o ontem e o amanhã.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

RESUMO	1
SUMMARY	3
Introdução	5
Objetivo Geral.....	7
Objetivos Específicos.....	7
Revisão de literatura.....	8
Cultivo Hidropônico.....	11
Metabolismo do Nitrogênio	13
Trocas Gasosas Foliares	18
Enzimas Antioxidantes.....	21
Análise de crescimento	22
Material e Métodos	27
Resultados	38
Composição dos voláteis foliares.....	54
Discussão.....	60
Considerações finais.....	67
Conclusões	69
Revisão bibliográfica	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do mecanismo de redução do nitrato a amônio (HAWKESFORD et al., 2012).....	15
Figura 2: Trocas gasosas: (A) – Taxa de assimilação líquida de CO ₂ (A_{net}); (B) - Condutância estomática (g_s); (C) - Taxa transpiratória (E); (D) - Eficiência do uso da água (EUA); (E) - Eficiência instantânea de carboxilação (A_{net}/C_i) de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivadas em solução nutritiva (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio. Os resultados correspondem a médias de quatro repetições nas cinco colheitas.....	39
Figura 3: Trocas gasosas: (A) – Velocidade máxima de carboxilação (V_{cmax}); (B) – Taxa de transporte de elétrons (J); (C) – Condutância do mesófilo (g_m^*); (D) - Utilização pela triosefosfato (TPU) e (E) - Taxa respiratória (R_d^*) de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivadas em solução nutritiva (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio. Os resultados correspondem a médias de quatro repetições nas cinco colheitas.....	40
Figura 4: Atividade da enzima Nitrato redutase de plantas jovens de araticum-de-terra-friacultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados correspondem as medias de quatro repetições nas cinco colheitas.....	41
Figura 5: Atividade da enzima Superóxido dismutase de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados correspondem as medias de quatro repetições nas cinco colheitas.	43
Figura 6: Atividade da enzima Peroxidase de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados correspondem as medias de quatro repetições nas cinco colheitas.....	44
Figura 7: Atividade da enzima Catalase de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados, com ajuste logarítmico, correspondem as medias de quatro repetições nas cinco colheitas.	45

- Figura 8: Atividade da Peroxidação lipídica (expresso pela formação de malonaldeído) de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados correspondem as medias de quatro repetições nas cinco colheitas..... 46
- Figura 9: A – Massa seca total (MST); B – Massa seca de raiz (MSR); C – Massa seca de caule (MSC); D – Massa seca de folha (MSF), E – Área foliar (AF) e F – Diâmetro da haste de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio. Os resultados correspondem a medias de quatro repetições nas cinco colheitas. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática..... 50
- Figura 10: Plantas de *Annona emarginata* cultivadas com diferentes níveis de nitrogênio, ao 206 DAT. As setas indicam as brotações. Botucatu – SP, 2013, CAMPOS, F. G. (2013)..... 51
- Figura 11: A - Razão de área foliar (RAF); B – Taxa de crescimento relativo (TCR); C – Área foliar específica (AFE); D - Taxa de assimilação líquida (TAL) e E – Peso específico de folha (PEF) de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio. Os resultados correspondem a medias de quatro repetições nas cinco colheitas. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática..... 52
- Figura 12: Distribuição de massa seca para folhas (A); Distribuição de massa seca para caule (B); Distribuição de massa seca para raiz (C) e Razão de massa foliar (D) de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio. Os resultados correspondem a medias de quatro repetições nas cinco colheitas. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática..... 53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos a que foram submetidas as plantas de <i>A. emarginata</i> cultivadas	28
Tabela 2: Temperatura do ar (°C), umidade relativa (%) e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), nas diferentes épocas de colheita.....	39
Tabela 3: Valores médios da atividade da nitrato redutase de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, em diferentes épocas de colheita.	42
Tabela 4: Valores médios da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase e peroxidação de lipídios de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, em diferentes épocas de colheita.....	47
Tabela 5: Valores médios de massa seca folha, massa seca de caule, massa seca de raiz massa seca total, diâmetro de caule e área foliar de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio.	49
Tabela 6: Composição química dos compostos voláteis foliares de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio.	55
Tabela 7: Compostos voláteis majoritários da composição química foliar de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio.	57
Tabela 8: Compostos voláteis minoritários (entre 1 e 3%) da composição química foliar de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio.....	58

Annona emarginata (SCHLTDL.) H. RAINER ‘araticum-de-terra-fria’ CULTIVADA COM VARIAÇÃO DE NITROGÊNIO: PRODUTIVIDADE E PERFIL QUÍMICO DOS VOLÁTEIS FOLIARES. Botucatu, 2014. 83p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: FELIPE GIROTTI CAMPOS

Orientadora: CARMEN SÍLVIA FERNANDES BOARO

RESUMO

A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’ possui grande potencial como porta-enxerto para o híbrido atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.), conferindo resistência contra a broca do tronco, característica dependente de seus metabolismos primário e secundário. O nitrogênio é um elemento essencial na síntese de aminoácidos, proteínas, entre elas, a Ribulose 1,5 – difosfato (Rubisco), ácidos nucleicos, clorofila e metabolitos secundários, entre outros importantes constituintes celulares. Além dessas funções, deve ser considerada sua relação de competição com o CO₂ e síntese de terpenos, por agentes redutores e esqueletos carbônicos. Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar a influência da variação do nível de nitrogênio na solução nutritiva, na produtividade e composição de voláteis foliares durante o desenvolvimento inicial de mudas de *A. emarginata*. Para o estudo da produtividade foram avaliadas as trocas gasosas, a atividade das enzimas nitrato redutase, catalase, peroxidase, superóxido dismutase, a peroxidação lipídica, a produção de massa seca de raiz, caule e folhas, área foliar, diâmetro de caule, razão de área foliar, taxa de assimilação líquida, taxa de crescimento relativo, peso específico de folhas, distribuição de massa seca para os diferentes órgãos do vegetal, razão de massa foliar e a composição de voláteis extraídos das folhas. As plantas cultivadas com níveis intermediários de nitrogênio apresentaram maior eficiência de carboxilação e taxa de assimilação de CO₂. A atividade da nitrato redutase variou com os diferentes níveis de nitrogênio a que as plantas foram submetidas. No maior nível de nitrogênio utilizado, as plantas com menor produtividade, demonstraram competição entre a fixação de nitrogênio, assimilação de CO₂ e síntese de terpenos. A atividade das enzimas antioxidantes preveniu a peroxidação lipídica nas plantas submetidas aos diferentes níveis de nitrogênio. As trocas gasosas, a atividade da nitrato

redutase e das enzimas antioxidantes nas plantas cultivadas com 78,75 e 118,12 mg L⁻¹ de N contribuíram com sua melhor produtividade. A variação de nitrogênio para o cultivo de *A. emarginata* modifica o perfil químico de seus voláteis foliares e o aumento do número de substâncias voláteis foliares com a diminuição do nível de nitrogênio sugere estresse das plantas.

Palavras chaves: Annonaceae; trocas gasosas; nitrato redutase; enzimas antioxidantes; terpenos.

Annona emarginata (SCHLTDL.) H. RAINER 'araticum-de-terra-fria' CULTIVATED WITH VARIATION OF NITROGEN: YELD, CHEMICAL PROFILE OF VOLATILE LEAF. Botucatu, 2014. 83p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: FELIPE GIROTTTO CAMPOS

Adviser: CARMEN SÍLVIA FERNANDES BOARO

SUMMARY

The species *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer 'araticum-de-terra-fria' has great potential as a rootstock for this hybrid atemoya (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) conferring resistance to stem borer. This resistance may be related to primary and secondary metabolisms. Nitrogen is an essential element on the synthesis of amino acids, proteins such as Ribulose 1,5 - diphosphate (Rubisco), nucleic acids, chlorophyll, secondary metabolites, and other important cellular constituents. Besides these functions, it should be considered competing relation to CO₂ by reducing agents and carbon skeleton. Therefore, the present study aimed to evaluate the influence of variation in the level of nitrogen in the nutrient solution on yield and composition of the leaf volatile during the early development of seedlings of *A. emarginata*. To study the productivity gas exchange were evaluated, the activities of nitrate reductase, catalase, peroxidase, superoxide dismutase, lipid peroxidation, the dry weight of roots, stems and leaves, leaf area, stem diameter ratio leaf area, net assimilation rate, relative growth rate, leaf specific weight, dry weight distribution to different organs of the plant, leaf mass ratio and the composition of volatiles extracted from the leaves. Plants grown with intermediate levels of nitrogen had higher carboxylation efficiency and CO₂ assimilation rate. Nitrate reductase activity varied with different levels of nitrogen that the plants were submitted. In the largest amount of nitrogen, plants with lower productivity, demonstrated competition between nitrogen fixation, CO₂ assimilation and synthesis of terpenes. The activity of antioxidant enzymes prevented lipid peroxidation in plants subjected to different levels of nitrogen. Gas exchange, the activity of nitrate reductase and antioxidant enzymes in plants grown with 78.75 and 118.12 mg L⁻¹ N contributed their best productivity. The variation of nitrogen for growing *A. emarginata*

modifies the chemical profile of the leaf volatile and increasing the number of leaf volatiles with decreasing nitrogen level suggests plant stress.

Keywords: gas exchange; Annonaceae; nitrate reductase; antioxidant enzymes; terpenes.

Introdução

A família Annonaceae apresenta 110 gêneros e 2400 espécies (CHATROU, 1999; CHATROU et al., 2004; CHATROU et al., 2012). Um dos gêneros, *Annona*, apresenta a espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’, com destaque por sua importância comercial, por ser um porta-enxerto para o híbrido atemoia, a qual apresenta frutos com sabor adocicado pronunciado e aroma característico, consumidos *in natura* e como polpa processada (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) (TOKUNAGA, 2005).

Vários estudos demonstram que espécies da família Annonaceae apresentam grande diversidade de substâncias sintetizadas em seu metabolismo secundário, tais como substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, esteroides, alcalóides, acetogeninas e óleos essenciais, entre outras (LEBOEUF et al., 1982; LIMA, 2012). Além disso, a família Annonaceae apresenta interesse para a indústria, com destaque para os óleos essenciais extraídos de folhas de *Rollinia leptopetala* L. (COSTA et al., 2008), alcalóides (SIMÕES et al., 2004) e acetogeninas (GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2005), com atividades biológicas (FAGUNDES et al., 2005; EDRIS et al., 2007; DE LA CRUZ-CHACÓN; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012).

O nitrogênio é um elemento essencial na síntese de aminoácidos, proteínas, como a ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), ácidos nucleicos, clorofila, metabolitos secundários, alcalóides, entre outros importantes constituintes celulares (LAWLOR et al., 1989; CRUZ, 2001; SOUZA; FERNANDES, 2006; GHOLAMHOSSEINPOUR et al., 2011; MARSCHNER, 2012).

Plantas submetidas a baixos níveis de nitrogênio não expressam todo o seu potencial genético, o que pode levar a mudanças morfológicas e fisiológicas (CRUZ, 2004). A deficiência de nitrogênio pode ocasionar alteração na alocação do carbono assimilado, modificando a proporção de amido, sacarose e monossacarídeos foliares (CRUZ, 2001). Além disso, a redução da atividade de carboxilação da Rubisco é causada pela deficiência de nitrogênio, uma vez que 30% desse elemento no vegetal encontra-se nessa enzima. Essa deficiência, portanto, poderá influenciar a fase bioquímica da fotossíntese e consequentemente a produção de terpenos devido a sua relação com a disponibilidade de esqueletos carbônicos (CRUZ, 2001).

Plantas de *Mentha piperita* L. cultivadas com excesso de nitrogênio apresentaram sinais de necrose das margens e ponta das folhas e murcha e queda das mesmas (LAWLOR et al., 1989; CRUZ, 2001). Os trabalhos anteriormente citados demonstram que tanto a deficiência como o excesso de nitrogênio podem ter implicações no metabolismo vegetal (LEAL, 2001; LAWLOR, 2002; MORAIS, 2009).

Com base no acima exposto, estudamos as relações da variação do nitrogênio com as trocas gasosas, atividade da nitrato redutase, enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica, que podem influenciar a produtividade das plantas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’ e a composição do compostos voláteis de suas folhas.

Objetivo Geral

Caracterizar a influencia da variação do nível de nitrogênio no desenvolvimento inicial de mudas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’ e nos compostos voláteis foliares.

Objetivos Específicos

Caracterizar as trocas gasosas de plantas jovens de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’, submetidas à variação dos níveis de nitrogênio.

Compreender a atividade da nitrato redutase e das enzimas antioxidantes, assim como a peroxidação lipídica, extraídas de folhas de plantas jovens cultivadas com variação de nitrogênio.

Estudar os índices fisiológicos, área foliar, matéria seca de folhas, caule, raiz e total e distribuição de matéria seca para os diferentes órgãos das plantas jovens de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’, submetidas à variação dos níveis de nitrogênio.

Caracterizar a composição dos compostos voláteis foliares extraídos das folhas de plantas submetidas à variação dos níveis de nitrogênio.

Revisão de literatura

Família Annonaceae

A família Annonaceae pertence ao grupo Eudicotiledôneas e ao clado magnoliídea (SOUZA; LORENZI, 2008; CHATROU et al., 2012). As plantas apresentam, de modo geral, porte arbóreo e folhas alternas, dísticas, simples, sem estípulas, com margem inteira. A inflorescência é cimosa, às vezes reduzida a uma única flor. As flores são usualmente grandes e vistosas, em geral bissexuadas e diclamídeas, com cálice trímero ou tetrâmero, dialissépalo e corola formada por dois verticilos de três pétalas. O fruto é apocárpico ou sincárpico (DIAS, 1988; LOBÃO et al., 2005; LORENZI; SOUZA, 2008).

A família Annonaceae apresenta importância evolutiva, ecológica e econômica, com aproximadamente 110 gêneros e 2400 espécies (CHATROU, 1999; MAAS et al., 2001; CHATROU et al., 2004; CHATROU et al., 2012). Em número de espécies Annonaceae é a família mais importante na ordem Magnoliales, encontrando-se entre as angiospermas mais primitivas (CHATROU et al., 2012).

As espécies pertencentes à família Annonaceae estão quase todas limitadas às regiões dos trópicos. Cerca de 900 espécies se encontram entre os Neotrópicos, 1200 nas áreas tropicais da Ásia e Austrália e aproximadamente 40 gêneros ocorrem nas Américas, 35 deles na América do Sul. A África é o continente que revela o menor número de espécies, aproximadamente 450 (CHATROU, 1999; MOHD KHALID, 2002; PINTO, 2005).

A família Annonaceae tem como centro de dispersão a região amazônica, as Guianas e o sudeste do Brasil, ocorrendo em florestas de terra firme, nas várzeas, nos cerrados e nos campos (MIRALHA, 1995; LOBÃO et al., 2005). Na região centro-leste do Brasil verificou-se a existência de 19 gêneros e 153 espécies, abrangendo o Distrito Federal e os estados de Goiás, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (MASS et al., 2001).

O gênero *Annona* apresenta-se como um dos mais importantes, devido principalmente aos seus frutos comestíveis, assim como o gênero *Cananga*, que apresenta espécies com óleos essenciais de interesse para a indústria (CHATROU et al., 2012).

Os frutos das anonáceas apresentam sabor adocicado pronunciado e aroma característico, sendo consumido *in natura* ou como polpa processada (TOKUNAGA, 2005). Na indústria ainda podem ter importância pela extração de metabólitos secundários como os óleos essenciais extraídos de folhas de *Annona coriacea* (SIQUEIRA et al., 2011) e alcalóides (SIMÕES e SCHENKEL, 2004).

Annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’

Essa espécie muitas vezes é referida como *Rollinia* sp. O gênero *Rollinia* foi descrito pela primeira vez pelo pesquisador Saint-Hilaire e publicado em 1824, no periódico “Flora Brasiliae meridionalis”, como resultado de atividades de coletas no início do século XIX, na região sudeste do território brasileiro. O nome “Rollinia” se deve a uma homenagem feita pelo classificador ao historiador francês Charles Rollin (1661-1741).

Estudos recentes em taxonomia utilizando técnicas moleculares reorganizaram as espécies e gêneros da família Annonaceae. Alguns gêneros foram incluídos em outros (SURVESWARAN et al., 2010; ZHOU et al., 2010; COUVREUR et al., 2012). Nessa organização deve-se considerar a proposta de Rainer (2007) em que o gênero *Rollinia* é apresentado como sinônimo do gênero *Annona*. No presente estudo serão considerados os trabalhos identificados na literatura consultada como *Rollinia* A. St.-Hil. e como *Annona*.

A espécie *araticum-de-terra-fria* nativa da América do Sul, encontrada na Bolívia, Peru, Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil (MAAS et al.,2001; USDA, 2009). No Brasil essa espécie é encontrada em altitudes de 950 m das regiões sul e sudeste. Em São Paulo, a sua ocorrência natural se verifica nos municípios de Cunha e Itapeva, localizados sobre a Serra do Mar e em São Bento do Sapucaí e Campos de Jordão, situados sobre a Serra da Mantiqueira. Na região sul do Estado de Minas Gerais, *araticum-de-terra-fria* ocorre nos municípios de Sapucaí Mirim, Gonçalves, Brasópolis, Ipuiuna, Cambuí e Marmelópolis, em áreas próximas a córregos. A espécie também é encontrada em todo o estado do Paraná (MAAS et al.,2001), em Lages, Videira, Joaçaba e Ibicaré, em Santa Catarina e no estado do Rio Grande do Sul, em Vacarias (TOKUNAGA, 2005).

Annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer ‘terra-fria’ apresenta hábito arbóreo de pequeno a médio porte, podendo alcançar entre 15 e 18m de altura, embora algumas espécies do mesmo gênero, como *Rollinia amazônica* R.E. Fr. e *Rollinia edulis*, possam alcançar 35m e 75 cm de diâmetro. Possui folhas lisas e lanceoladas com brilho em sua face adaxial (JOLY, 2002), apresentando, em média, 2,5 cm de largura na parte mediana e 6 cm de comprimento, o que pode variar entre plantas devido ao seu vigor. As flores são em forma de hélice, perfumadas, de coloração creme e apresentam florescimento concentrado no mês de outubro. A maturação dos frutos ocorre na 2ª quinzena de fevereiro e eles possuem, em média, 4 cm de diâmetro, 3 cm de altura e cerca de 50 g, podendo conter até 43 sementes (TOKUNAGA, 2005).

Espécies do gênero *Rollinia* apresentam importância na medicina popular e podem ser utilizadas como anticarcinogênicas, no tratamento de reumatismo, cólicas e problemas do aparelho digestivo. Além disso, também apresentam ação inseticida e importância como espécies ornamentais (LEBOEUF et al.,1982; ALALI et al.,1999; MAIRESSE, 2005; PINTO et al.,2005).

No gênero *Rollinia*, apenas nove espécies foram identificadas quimicamente. O nome *Rolinia* foi referido pela primeira vez por Hartwell em 1967, em seu estudo realizado no oeste da Índia e Indonésia, em que destacou *Rollinia mucosa* L. em tratamentos de tumores. No gênero foi identificado tanino (GIBBS, 1974), compostos cianogênicos em *Rollinia emarginata* (Schltdl.) (SEIGLER et al.,1979) e óleos essenciais em sementes de *Rollinia mucosa* (NGIEFU et al.1976). O isolamento de “acetogenina anonácea” foi reportado pela primeira vez por Dabrah e Sneden (1984),

descoberta que gerou grande interesse pelo gênero *Rollinia* (MAAS et al., 2001), uma vez que, esta substância apresenta ação contra vários carcinomas humanos (ZENG et al., 1996; ALALI et al., 1999; MAIRESSE, 2005).

A espécie araticum-de-terra-fria foi utilizada como porta-enxerto de atemoia, pela primeira vez pelo agricultor Pedro Costa em São Bento do Sapucaí (SP). Nessa região, a espécie é conhecida como *Rollinia emarginata* (Schltdl.), sendo o araticum-mirim conhecido como *Rollinia* sp. Verifica-se, portanto, que a nomenclatura utilizada na região de São Bento do Sapucaí é contrária à literatura. Mesmo considerando a confusão de nomenclatura, deve ser destacado o fato de ter sido descoberto um excelente porta-enxerto (SCALOPPI JUNIOR, 2007), que quando utilizado como porta-enxerto para atemoia, outra Annonaceae, forma uma copa mais vigorosa (KAVATI, 1998; BONAVENTURE, 1999; TOKUNAGA, 2005). Outra vantagem da utilização do porta-enxerto araticum-de-terra-fria é a sua elevada resistência contra pragas que atacam a cultura de atemoia como broca do caule (KAVATI; WATANABE, 2010).

A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’, portanto, tem importância econômica como porta-enxerto para atemoia, espécie que apresenta o fruto com grande potencial econômico.

Cultivo Hidropônico

A hidroponia teve origem em experimentos que visavam determinar os elementos essenciais ao desenvolvimento vegetal (CASTELLANE; ARAÚJO, 1994). É uma técnica na qual se utiliza água e sais minerais para o desenvolvimento de plantas em ambientes protegidos. Esse método de cultivo foi empregado na antiguidade e vem sendo utilizado, principalmente, no cultivo de hortaliças e flores (PELLINCER et al., 1995).

O sucesso do cultivo hidropônico está diretamente relacionado à solução nutritiva, pois é esta que determina o crescimento das plantas e a qualidade do produto final, mas isso varia de acordo com a espécie e o requerimento nutricional da planta. A idade das plantas, época do ano e condições climáticas locais, influenciam a eficiência da solução nutritiva (FAQUIM, 1996).

Na solução nutritiva fatores como temperatura, com níveis ótimos em $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$, pH, entre 5,5 e 6,5 e condutividade elétrica da solução nutritiva, entre 1,5 e $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, devem ser monitorados e controlados periodicamente (FURLANI et al.,1999). O controle do pH é relevante para a manutenção da integridade das membranas e para evitar precipitação de micronutrientes como ferro, boro e manganês ou do fósforo (MARTINEZ, 2002). A condutividade elétrica encontra-se diretamente associada à concentração iônica e a absorção dos nutrientes pela cultura ao longo do seu desenvolvimento (MARSCHNER, 2012). No Brasil a hidroponia é utilizada como meio de produção vegetal e como essa técnica busca atender os mercados mais exigentes pela qualidade dos produtos, a hidroponia se mostra promissora (FURLANI et al.,1999). Os autores ainda referem que várias soluções nutritivas vêm sendo propostas e as mesmas apresentam diferenças marcantes na concentração dos macronutrientes. Entre elas, a mais utilizada para fins de investigação do estado nutricional das plantas e a de Hoagland e Arnon (1950).

O cultivo hidropônico apresenta vantagens para o cultivo de plantas condimentares e medicinais em relação ao cultivo convencional, reduzindo o extrativismo, melhorando a qualidade do produto, aumentando a produtividade por área, com isenção ou redução do uso de agrotóxicos, utilizando baixos volumes de água e reduzindo a quantidade de fertilizantes, podendo-se obter rápido retorno (JESUS FILHO, 2000).

As plantas medicinais, aromáticas e condimentares cultivadas em hidroponia podem atender um mercado mais abrangente, como farmácias de manipulação, comércio de condimentos, feiras livres e venda de mudas. Outra possibilidade de comércio são os óleos essenciais (JESUS FILHO, 2000).

Annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’ foi cultivada por Baron et al., (2013) em solução de Hoagland e Arnon (1950), diluídas a 50% e 75% de sua força iônica, soluções em que as plantas jovens de araticum-de-terra-fria se desenvolveram melhor, o que foi explicado pelo autor com base na rusticidade da espécie.

Metabolismo do Nitrogênio

A absorção do nitrogênio é mediada por dois tipos de carregadores. Os carregadores de baixa afinidade (Low Affinity Transport System – LATS) que são proteínas constitutivas, que operam quando a concentração externa de N é elevada. Os carregadores de alta afinidade (High Affinity Transport System – HATS) podem ser constitutivos e atuam em condições de baixas concentrações externas de N (Constitutive High Affinity Transport System - CHATS) ou induzidos pela exposição ao N (Inducible High Affinity Transport System - IHATS) (ASLAM et al., 1992; LEA, 1993; VON WIRÉN et al., 1997).

O nitrogênio é um elemento essencial na síntese de aminoácidos, ácidos nucleicos, entre outros importantes constituintes celulares (SOUZA; FERNANDES, 2006), além de vários metabolitos secundários (MARSCHNER, 2012). Para que a planta consiga suprir sua demanda de nitrogênio ela conta com a absorção de nitrogênio em duas formas, NO_3^- e NH_4^+ , que demandam quantidades diferentes de energia para sua assimilação uma vez que, o nitrato entra em uma forma muito oxidada, necessitando ser reduzido até amônio para ser incorporado, processo que demanda muita energia, indicada pela maior taxa de liberação de CO_2 respiratório, diferente do íon amônio, que é absorvido na forma pronta para ser incorporado, demandando menos energia, assim liberando menos CO_2 (WEGER; TURPIN, 1989).

Nitrato em concentrações externas inferiores a 100-200 μM é transportado pela membrana via carregadores de alta afinidade (HATS), com K_m (é a quantidade de substrato necessária para o transportador exercer metade da sua velocidade máxima) entre 7 e 100 μM . Acima dessas concentrações, a absorção de nitrato ocorre pelos carregadores de baixa afinidade (LATS), com K_m maior que 0,5 mM (VON WIRÉN et al., 1997). Já a absorção de amônio é mediada pelo HATS quando a concentração externa do íon é menor que 1mM, enquanto que o LATS é responsável pela absorção de amônio em concentrações externas superiores a 1mM. (VON WIRÉN et al., 1997).

Um quarto da energia gerada pela fotossíntese, na forma de ATP e $\text{NADPH}+\text{H}^+$ e é utilizada para assimilar compostos inorgânicos no processo denominado fotoassimilação, é utilizada na assimilação do nitrogênio (LEMOS et al.,

2008). Portanto, a assimilação do nitrato é um processo que envolve uma série de reações bioquímicas, que consomem elevada quantidade de energia (12 ATP para cada N inorgânico incorporado em formas orgânicas) (MARENCO; LOPES, 2005). Uma delas é a redução do nitrato a nitrito, pela reação que ocorre no citoplasma. O nitrito gerado é rapidamente transportado para o cloroplasto, onde reações catalisadas pelas enzimas nitrito redutase (NIR) e glutamato sintase (GOGAT) irão transformá-lo em amônio e incorporá-lo em cadeias carbônicas, em reações que necessitam de agentes redutores fornecidos pela cadeia transportadora de elétrons na fase fotoquímica não cíclica da fotossíntese (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2007; HAWKESFORD et al., 2012).

As plantas utilizam a luz para fixar o CO₂ em carboidratos em suas folhas. Elas utilizam o mesmo sistema para incorporar nitrato, enxofre e fósforo absorvidos pelas raízes, que são convertidos em aminoácidos e nucleotídeos, na presença de luz em tecidos fotossintéticos (STITT et al., 2010). Um dos fatores limitantes à redução do nitrato nas raízes é o elevado requerimento de carboidrato, associado ao processo de redução (MARENCO; LOPES 2005).

Ambiente com alta luminosidade causa fotoinibição ou fotoxidação do fotossistema, desse modo à redução do nitrato pode funcionar como um dreno alternativo de elétrons, usando o excesso de energia para a redução do nitrato presente nas folhas (BLOOM et al., 2010).

Atmosfera com elevada concentração de CO₂ pode reduzir a assimilação de nitrato, uma vez que, os redutores produzidos pela fotossíntese são necessários para assimilação de carbono e nitrogênio (BLOOM et al., 2010).

A enzima nitrato redutase (EC 1.6.6.1) é a primeira enzima na cadeia de assimilação do N nas plantas (PURCINO et al., 1994). Nas plantas superiores, a nitrato redutase é uma flavoproteína formada por duas subunidades idênticas, com três grupos prostéticos: a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), o grupo heme e um complexo constituído entre o molibdênio e uma molécula orgânica denominada pterina (complexo-Mo) (Figura 1). Essa constituição é responsável por sua denominação de molibdopterina (CAMPBELL, 1999). O NADH liga-se ao FAD de cada subunidade e inicia a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C) até o grupo amino terminal (N). Os elétrons atravessam o grupo heme e chegam ao complexo molibdênio, onde ocorre a redução do nitrato a nitrito (TAIZ, ZEIGER, 2013). A

assimilação do amônio é competidora tanto da fase fotoquímica quanto da bioquímica da fotossíntese uma vez que, demanda ATP e elétrons provenientes da ferredoxina, em tecidos fotossintéticos. Nos tecidos não fotossintéticos o doador de elétrons é o $\text{NADH}+\text{H}^+$ ou também pode funcionar como auxiliar do $\text{NADPH}+\text{H}^+$ nos tecidos fotossintéticos (SHEN et al., 1975; AHMAD; ABDIN, 1999;). Na fase bioquímica a competição ocorre por cadeia carbônica (2-oxoglutarato) onde o amônio é incorporado, afetando a atividade da RubP (Ribulose 1,5 bifosfato), que também utiliza a mesma cadeia, o que ocasiona diminuição na velocidade de formação de carboidratos (NUNES-NESI et al., 2010; BLOOM et al., 2010; BOWSHER et al., 2007).

Elevada concentração de nitrato ocasiona aumento da atividade da nitrato redutase e da concentração de nitrito, cujo acúmulo na célula se deve ao fato da nitrito redutase não apresentar a mesma eficiência da nitrato redutase. Nessa condição, a nitrato redutase exerce outra função, ou seja, converte o nitrito à oxido nítrico, que em elevadas concentrações leva a fechamento estomático (NEILL et al., 2008)

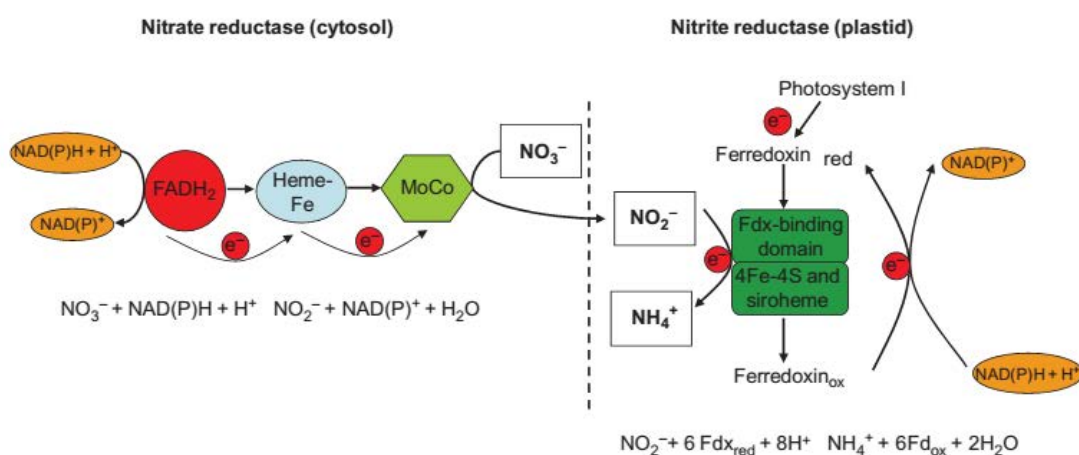


Figura 1: Esquema do mecanismo de redução do nitrato a amônio (HAWKESFORD et al., 2012)

A atividade da nitrato redutase é regulada pela fosforilação e por uma proteína específica conhecida como 14-3-3. A completa inativação ocorre quando a forma fosforilada é associada à proteína 14-3-3. A ativação da nitrato redutase

ocorre na dissociação dessa proteína 14-3-3 e, a seguir, sua desfosforilação (BUCHANAN et al., 2000).

No escuro ou em condições de baixo nível de CO₂, a nitrato redutase é fosforilada por proteínas quinases, em um resíduo de serina localizado entre as subunidades prostéticas complexo-Mo e FAD, sendo a nitrato redutase fosforilada ainda ativa. No entanto, a seguir ocorre a ligação da proteína 14-3-3, na região fosforilada, tornando-a inativa. O complexo formado pela nitrato redutase fosforilada e a proteína 14-3-3 é mais rapidamente degradado do que a nitrato redutase livre. Quando o complexo nitrato redutase e proteína 14-3-3 é desfeito, uma fosfatase remove o fosfato, ativando a enzima. Este mecanismo reversível permite o rápido controle da atividade da nitrato redutase, sendo útil, em especial, em ambientes onde as condições não favorecem a assimilação de nitrato, como por exemplo, em condições de limitação luminosa ou baixa disponibilidade de CO₂ (SOUZA, et al., 2002)

A nitrato redutase, em condições normais de ativação e na presença de luz, apresenta 70% a 90% de ativação, reduzida para 10% a 30% no escuro. A luz não é um sinal direto para sua atividade, pois mesmo sob intensa e contínua luminosidade, a nitrato redutase é inativa na ausência de dióxido de carbono, indicando que a fotossíntese é requerida para sua ativação (KAISER; HUBER, 2001).

Em condições de níveis inadequados de nitrogênio, não ocorre total expressão do potencial genético, ocorrendo alterações morfológicas e fisiológicas, que afetam, negativamente, o crescimento das plantas. A deficiência de nitrogênio, além de reduzir o crescimento, pode afetar a partição de assimilados entre as diferentes partes da planta, ocasionando, geralmente, aumento na relação entre a massa seca das raízes e a massa seca da parte aérea (CRUZ, 2004).

O transportador de nitrato, NRT1.1, também facilita a distribuição da auxina pela planta. No entanto, na presença de elevadas concentrações de NO₃⁻ em *Arabidopsis thaliana*, a fração da auxina dependente do transportador NRT1.1 é inibida, não ocorrendo seu fluxo para a epiderme, ocasionando seu acúmulo na região de formação de raiz lateral (KROUK et al., 2010; BEECKMAN; FRIML, 2010).

A citocinina, hormônio regulador de respostas morfológicas, ramificação de parte aérea, síntese de proteína e aquisição de macronutrientes, em sua maior parte sintetizada nos ápices das raízes é exportada pelo xilema, acumulando-se

nos locais de maior transpiração (NUNES-NESI et al., 2010; GUTIÉRREZ et al., 2013). Em *Arabidopsis thaliana* a expressão dos genes da via de síntese de citocinina, *AtIPT3* e *AtIPT5*, é modulada pela disponibilidade de nitrogênio e o *AtIPT3* principalmente por NO_3^- (TAKEI et al 2004).

As plantas cultivadas com menor disponibilidade de NO_3^- também apresentam menores concentrações de clorofila total e de fósforo inorgânico (Pi), com reduções de 45% e de 62%, respectivamente. Diversos trabalhos têm identificado uma relação positiva entre a concentração foliar de nitrogênio e a taxa fotossintética líquida, visto que esse elemento é parte integrante dos principais componentes do sistema fotossintético, tais como, clorofila e ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase / oxigenase (Rubisco). Além disso, com deficiência de nitrogênio, a atividade carboxilativa da Rubisco é seriamente reduzida (CRUZ, 2001).

Portanto, a capacidade fotossintética e a produção de biomassa estão relacionadas com o teor de nitrogênio da planta. A partição de fotoassimilados entre o metabolismo do carbono e a assimilação do nitrogênio é um processo bem regulado. Elevados níveis de amônio induzem a degradação de carboidratos, para a produção de esqueletos carbonados para formar aminoácidos (LAWLOR, 2002).

Nos tecidos vegetais, a concentração de nitrogênio é um fator importante na regulação do fluxo de carbono em direção à síntese mais intensa de proteínas (alto teor de N) ou de carboidratos (baixo teor de N) (LAWLOR, 2002). Observa-se que, com deficiência de nitrogênio, ocorre redução de crescimento e alteração na partição de matéria seca. Essa deficiência reduz a concentração dos açúcares solúveis totais e açúcares não-redutores e aumenta a concentração de amido foliar (LEMOS et al., 2008).

A Rubisco presente em folha de trigo corresponde a 30% do N e 50% das proteínas solúveis (LAWLOR et al., 1989). Em contrate, o teor de proteína Rubisco e o conteúdo de proteínas solúvel por unidade de cloroplasto foi maior na presença de elevada concentração de nitrogênio. Baixa concentração de nitrogênio interfere com a captação e a assimilação de CO_2 , que foi menor do que o transporte de elétrons (LAWLOR et al., 1989).

Baixas concentrações de nitrogênio promovem decréscimo na fotossíntese e, conseqüentemente, no crescimento, além de diminuir a concentração de

aminoácidos foliares, devido à baixa síntese de proteínas. Essa condição ainda resulta em acúmulo de carboidratos nas folhas, levando a baixa relação C/N (LAWLOR, 2002).

Estudos da distribuição do N nas folhas do dossel fotossintético para melhorar a eficiência do uso da luz, sugere distribuição ideal para maximizar a fotossíntese do dossel, aumentando a taxa fotossintética (SHIRATSUCHI et al., 2006).

Os carboidratos, aminoácidos e nucleotídeos, resultantes da fotossíntese e da assimilação do nitrogênio, são transportados para o crescimento dos tecidos onde são convertidos em macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos e lipídios, além de metabolitos secundários, como fenilpropanóides, flavonoides, terpenos, glicosilatos e alcalóides, importantes para as funções celulares e de adaptação contra estresses bióticos e abióticos (STITT et al., 2010).

Segundo Martins et al.,(1995), entre os fatores que interferem com os princípios ativos, a nutrição requer atenção, pois o excesso ou a deficiência de nutrientes pode estar diretamente correlacionada com variação de produção de substâncias ativas. Acréscimo de nitrogênio levou a maior produção de óleo essencial na *Menta piperita* e *Ocimum basilicum*. No entanto, observou-se redução de mentol e linalol nesses óleos. Aumento de fósforo resultou em maior teor de mentol em *Menta piperita* e linalol e estragol em *Ocimum basilicum* (MORAIS, 2009).

Excesso de nitrogênio na solução nutritiva ao longo do ciclo revelou diminuição dos teores de mentol e 1-8 cineol e aumento dos teores de pulegona e de acetato de mentila, quando as colheitas de *M. piperita* foram realizadas aos 70, 80 e 90 dias após o transplante das mudas para a solução nutritiva (LEAL, 2001).

Trocas Gasosas Foliares

Troca gasosa é um processo fisiológico bem elucidado no reino vegetal além de essencial para a sobrevivência das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Intimamente ligado com a fotossíntese é o processo básico para acúmulo de cerca de 95% de matéria seca (ALFONSI, 2003; EPSTEIN; BLOOM, 2006; MARSCHNER, 2012).

O padrão de trocas gasosas no decorrer do dia e do ano depende das condições internas e externas da planta, estando relacionado com o clima. Sempre que um fator se apresenta em nível mínimo pode se tornar limitante para a absorção do

CO₂ por certo tempo. Na natureza, raras vezes os fatores externos favorecerem a ocorrência de picos de fotossíntese (LARCHER, 2006). Conforme anteriormente referido, a taxa fotossintética é influenciada pela concentração de nitrogênio da planta (LAWLOR, 2002).

O acesso do CO₂ no aparelho fotossintético se deve à abertura estomática, sendo a sua variação dependente da condutância estomática (g_s), que afeta a transpiração e a assimilação de CO₂ (A_{net}) (RASCHKE, 1979; HABERMANN, 2004). Segundo Larcher, (2006), apesar dos estômatos reagirem a vários fatores, o movimento estomático obedece principalmente ao controle dos circuitos do CO₂ e da H₂O. Quando a pressão parcial de CO₂ nos espaços intercelulares diminui devido ao consumo de CO₂ pelo processo de fotossíntese, os estômatos se abrem. Outros fatores afetam o movimento estomático, tais como as variações da concentração do ácido abscísico (FARQUHAR; SHARKEY, 1982), da temperatura (BERRY; BJORKMAN 1980, GUTSCHICK 1997) e da nutrição mineral (EPSTEIN; BLOOM 2006; MARSCHNER 2012). Estão bem documentadas as relações fotossintéticas com os elementos minerais (MALAVOLTA, 1980; GUTSCHICK, 1997; MENGEL; KIRKBY, 2001; EPSTEIN; BLOOM, 2006; MARSCHNER, 2012).

As espécies de Anonáceas, fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) e cherimóia (*Annona cherimola* Mill.), estudadas em regimes alternados de temperatura dia/noite (30°/25°C) apresentaram comportamentos distintos. A fruta-do-conde apresentou maior desenvolvimento quando comparada com a cherimóia, que revelou menor assimilação de carbono, devido a diminuição do conteúdo de clorofila foliar, fechamento estomático, aumento da respiração e limitação da carboxilação (HIGUCHI et al.,1999).

A elevada taxa de sobrevivência e de crescimento de plântulas de *Annona glabra* se deveu à sua habilidade em manter elevada condutância estomática e taxa fotossintética líquida em condições de alagamento (MIELKE et al.,2005).

Annona squamosa L. manteve a taxa fotossintética inalterada, mesmo em condições de irradiação variando entre 250 e 350 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$.(UTSUMAMIA; HIGUCHI, 1995). Segundo Marler, (1996) para *A. squamosa* o ponto de saturação luminoso é de 700 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Os minerais apresentam importância no processo fotossintético e respiratório, devido às suas funções de constituinte de enzimas e pigmentos, ou ainda ativador direto do processo fotossintético (LARCHER, 2006).

Estudos realizados com *A. emarginata* cultivada em solução nutritiva com força iônica de 50% da solução completa de Hoagland e Arnon demonstraram que a taxa de assimilação de CO₂ (A_{net}) e a eficiência de carboxilação (A_{net}/C_i) foi elevada indicando melhor aproveitamento dos elementos minerais fornecidos o que revelou um aumento na taxa fotossintética das folhas adultas (BARON et al., 2013). O autor também observou elevados valores de eficiência do uso da água (*EUA*), que segundo Klar (1984) indicam elevadas taxas de absorção de CO₂ e provavelmente, grande consumo de água, porém o que foi verificado nesse estudo, foi redução da transpiração e elevada taxa de assimilação de CO₂, mediada pela atividade da Rubisco, o que resultou em maior eficiência do uso da água (BARON et al., 2013).

Para estudar o potencial fotossintético determina-se a curva A_{net}/C_i , calculando-se a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), a taxa de transporte fotossintético de elétrons (J), a limitação do uso da triose fosfato (*TPU*), a taxa de respiração durante o dia (*Rd*) e a condutância do mesófilo (*gm*) (SHARKEY et al., 2007).

A V_{cmax} é a taxa máxima de carboxilação da Ribulose 1,5-bifosfato, que apresenta relação com a concentração de N como demonstrado no estudo de Pettersson e Macdonald, (1994), que apresentou melhor atividade em ambientes com elevado nível de nitrogênio.

A taxa de transporte de elétrons (J) é utilizada para estimar a taxa máxima do transporte de elétrons em luz saturante e se baseia no número de elétrons requeridos para redução do NADP à NADPH + H⁺, utilizado pela triose fosfato na regeneração da Rubisco (SHARKEY et al., 2007).

O terceiro estágio chamado limitação do uso da triose fosfato ocorre quando as reações do cloroplasto tem maior capacidade do que a capacidade da folha de usar os produtos dos cloroplastos, primariamente, mas não exclusivamente triose fosfato. Nesta condição a fotossíntese não responde ao incremento de CO₂, não é inibida pelo aumento na concentração de O₂. Essa limitação pode frequentemente estabelecer a assimilação máxima (A_{max}). Como A_{max} é frequentemente estabelecido pela

TPU, fornece informação sobre um processo que raramente determina A_{net} sob condições naturais. A_{max} não pode ser estimado (HARKEY et al., 2007).

Quando a fotossíntese é limitada pela TPU há acúmulo de carbono na câmara subestomática (C_i) (HARLEY; SHARKEY 1991, SHARKEY et al., 2007; LIANHONG et al., 2010).

A R_d é a liberação de CO_2 respiratório sendo excluído o CO_2 proveniente da fotorrespiração, ou seja, principalmente respiração mitocondrial (SHARKEY et al., 2007).

A condutância do mesófilo (g_m) é o inverso da resistência à difusão biofísica do CO_2 , que se difunde dos espaços intercelulares para os sítios de carboxilação. Valores baixos de g_m ocasionam menor inclinação na curva A_{net}/C_i (SHARKEY et al., 2007).

Enzimas Antioxidantes

Os dois principais processos envolvidos na formação de espécies reativas de oxigênio durante a fotossíntese estão diretamente envolvidos com a fotorredução do O_2 ao radical superóxido por redução dos componentes da cadeia transportadora de elétrons associado com o fotossistema I e com as reações ligadas ao ciclo da fotorrespiração, incluindo a Rubisco no cloroplasto e glicolato-oxidase e a catalase e peroxidase nos peroxissomos (APEL; HIRT, 2004).

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é a primeira resposta bioquímica das células eucarióticas submetidas a estresses bióticos e abióticos e a sua produção em plantas é conhecida como estresse oxidativo (ANJUM et al., 2011), sendo responsáveis em causar danos na membrana plasmática, macromoléculas como DNA e proteínas. Monitoramento do dano ocasionado pelas EROs pode ser realizado pela avaliação da peroxidação lipídica, uma vez que, os ácidos graxos presentes nos lipídios são o principal alvo dessas espécies reativas (APEL; HIRT, 2004). Nesse sentido, quando houve acúmulo de cromo em plantas de *Ocimum tenuiflorum* L. cultivada na sua presença, observou-se produção de malonaldeído, substância citotóxica proveniente da peroxidação lipídica, gerado devido ao excesso de radicais livres (RAI et al., 2004).

A eliminação de O_2^- e H_2O_2 em células vegetais, provenientes das reações envolvidas na fotossíntese e respiração, requer a ação conjunta de enzimas antioxidantes. O superóxido (O_2^-) pode ser dismutado em H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD) no cloroplasto, mitocôndria, citoplasma e peroxissomo. A peroxidase (POD) e a catalase (CAT) desempenham papel fundamental na eliminação do peróxido de hidrogênio. A catalase é a enzima principal para eliminação de H_2O_2 na mitocôndria (SHIGEOKA et al., 2002).

Catharanthus roseus cultivado com diferentes fontes de nitrogênio mostrou alteração na atividade das enzimas antioxidantes. Quando amônio foi utilizado, observou-se maior atividade da catalase (CAT), glutamina redutase (GR) e glutamina-S-transferase (GST) nas regiões apicais, medianas e basais das folhas e nas raízes. Maior atividade da peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) foi observada nas plantas cultivadas com nitrato (MISRA; GUPTA, 2005).

Análise de crescimento

A ferramenta análise de crescimento é o meio mais acessível e bastante preciso para avaliar o crescimento do vegetal através da contribuição fotossintética no acréscimo de massa (CAUSTON; VENUS, 1981; MAGALHÃES, 1986). Essa análise pode ser utilizada para detectar diferenças no crescimento acarretadas por fatores genéticos, tratamento submetido ou o ambiente onde foram cultivadas (BENINCASA, 2003).

O crescimento das plantas superiores depende da conversão da energia luminosa em energia química e assimilação de carbono. Para estimar a produtividade, resultante dessa assimilação, as estimativas dos índices fisiológicos, razão de área foliar (RAF) e índice de área foliar (IAF), que representam os componentes morfológicos da taxa de crescimento relativo (TCR), a taxa de assimilação líquida (TAL), peso específico de folha (PEF), razão de massa foliar (RMF) podem auxiliar os estudos de crescimento das espécies e distribuição de massa seca pela planta (LAMBERS, 1987).

A taxa de assimilação líquida (TAL) é resultado da interação entre fatores ambientais, luz, CO_2 , temperatura, água, disponibilidade nutricional, idade da folha, entre outros e as diferenças específicas de cada espécie, de acordo com o seu

genotipo (LAMBERS et al., 2008). A TAL reflete a eficiência do sistema assimilador que está envolvido na produção de matéria seca (RADFORD, 1967).

Mudas de araticum-de-terra-fria cultivadas em solução com diferentes forças iônicas apresentaram melhores TCR e TAL, quando mantidas em 50 e 75% de força iônica. As plantas cultivadas em 25% de força iônica, com as menores concentrações de minerais, apresentaram piores resultados, enquanto resultados intermediários foram observados nas plantas cultivadas em 100% da força iônica. (BARON et al., 2013).

A razão de área foliar (RAF) é o índice fisiológico que expressa a área foliar útil para a fotossíntese, sendo um componente morfofisiológico da análise de crescimento (SILVA, 2000). Está razão utilizada para avaliar efeitos genotípicos e climáticos, com tendência à queda na medida em que a planta cresce, pois a área foliar útil diminui com o passar do tempo (RODRIGUES, 1982).

A área foliar específica reflete o inverso da espessura da folha (BENINCASA, 2003) e no início do desenvolvimento os valores da AFE podem ser maiores, revelando folhas pouco espessas, com pouca massa seca e área foliar, assim com o desenvolvimento da cultura aumenta a área foliar e a massa seca das folhas, tendendo a queda dessa variável. Pinzón-Torres e Schiavinato (2008) afirmam que alguns autores apontam a AFE como o índice que melhor explicaria as diferenças na TCR, entre espécies vegetais.

A taxa de crescimento relativo (TCR) reflete o aumento da massa seca, de uma planta ou de qualquer órgão desta, num intervalo de tempo em função do seu tamanho inicial (BENINCASA, 2003). Ela é considerada um dos índices mais sensíveis para medir a capacidade competitiva do vegetal, apresentando relação positiva com a taxa de sobrevivência. Valores elevados de TCR indicam maior habilidade competitiva e a espécie pode crescer de forma eficiente em ambientes com recursos limitados (CAI et al., 2007; GUAN et al., 2008).

Os índices fisiológicos acima referidos podem apresentar influência da variabilidade genética que as espécies silvestres apresentam (LARSCHER, 2006), das condições climáticas (ALVAREZ et al., 2005) e dos níveis nutricionais empregados (XAVIER, 1976; BARON et al., 2013)

Metabolitos secundários em Annonaceae

As anonáceas são empregadas na etnofarmacologia devido às suas diferentes propriedades farmacológicas, atribuídas principalmente às acetogeninas e alcalóides, dois dos principais constituintes bioativos encontrados em anonáceas (FAGUNDES et al., 2005; BERMEJO et al., 2005).

Revisão sobre fitoquímica da família Annonaceae registra a predominância de alcalóides aporfinicos e oxoaporfinicos dentre os metabólitos secundários isolados de diferentes espécies. Além dos alcalóides também são encontrados polifenóis, óleos essenciais, terpenos e substâncias aromáticas (LEBOEUF et al., 1982).

Os alcalóides encontrados na família Annonaceae são quinolínicos, isoquinolínicos (MISHRA et al., 2009) e oxoaporfinico liriodenina, mais encontrado na família Annonaceae (SANTOS et al., 2003), ao contrário dos alcalóides β -carbolínicos, menos encontrados (WANG et al., 2002).

Entre os compostos fenólicos, os flavonóides são verificados em maiores concentrações na família (SIMÕES et al., 2004), entre os quais, *O*-glicosídeos de apigenina, kaempferol, quercetina, e luteolina (SANTOS; SALATINO, 2000). Os flavonóides são substâncias redutoras (SIMÕES et al., 2004) derivadas das chalconas. Ocorrem em uma variedade de formas estruturais, contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico (HARBONE, 1984). Estão presentes em todas as partes das plantas, desde raízes até as flores e os frutos. Ocorrem em forma livre (aglicona) ou ligada a açúcares (glicosídeos). Os mais observados nas *Annonas* são os flavonóis e seus derivados glicosilados, estando presentes tanto os *O*-glicosídeos como os *C*-glicosídeos (SANTOS e SALATINO, 2000).

Os esteróides de maior ocorrência são β -sitosterol e o estigmasterol (LEBOEUF et al., 1982).

A rota do ácido mevalônico, principal via de formação dos sesquiterpenos, demanda $2\text{NADPH} + \text{H}^+$ (BACH et al., 1995). Deve ser ressaltado que essa rota também atua na dissipação do excesso de energia fotossintética em ambientes com elevada luminosidade.

Os terpenos são formados da combinação de várias unidades bases, constituídas por cinco carbonos, denominadas de isopreno. A biossíntese dos

terpenos depende da síntese de isopentenil fosfato (IPP). Os terpenos podem apresentar diferentes estruturas e funções sendo divididos em classes, hemiterpenos (5 C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), triterpenos (30 C) e tetraterpenos (40 C) (DEWICK, 2002; BAKKALI et al., 2008). A formação do isopreno, unidade base dos terpenos, que são grupos de substâncias presentes no óleo essencial, necessita o equivalente a três moléculas de ATP e em uma das etapas de formação do agente redutor, NAD(P)H^+ , fonte doadora de elétrons para a redução do fosfato metileritritol até o isopreno, principal rota de formação dos monoterpenos (ZHAO et al., 2013; SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013).

Muitas anonáceas são perfumadas, devido à presença de óleos essenciais. Os constituintes destes óleos são geralmente monoterpenos e sesquiterpenos ou compostos aromáticos. A presença de biciclogermacreno, (*E*)-cariofileno, γ -muuroleno, α -humuleno, espatulenol e β -elemeno tem sido registrada em espécies da família Annonaceae (LEBOEUF et al., 1982). Em *Rollinia leptopetala* foram identificados 22 constituintes no óleo, mistura complexa de monoterpenos (54,5%) e sesquiterpenos (45,5%). O principal componente encontrado nas folhas foi o biciclogermacreno (22,47%) (COSTA et al., 2008). *Duguetia furfuracea* apresentou elevada porcentagem de monoterpenos, sendo β -felandreno, mirceno, α -felandreno, terpin-4-ol, sabineno, *p*-cimeno; sabineno, terpin-4-ol, *p*-cimeno majoritários e alguns sesquiterpenos, sendo majoritário o biciclogermacreno (VALTER et al., 2008). Na *Annona squamosa* a composição foi de hidrocarbonetos monoterpenos (2,5%), hidrocarbonetos sesquiterpenos (76,0%) e sesquiterpenos oxigenados (7,1%). β -cariofileno (23,0%), germacreno D (21,3%), biciclogermacreno (8,5%) e β -elemeno (7,8%) foram os constituintes principais desse óleo (GARG; GUPTA, 2005). Chavan et al., (2006) avaliaram o óleo essencial da casca de *Annona squamosa* e demonstraram sua atividade contra bactérias gram positivas, que foi relacionada com a elevada porcentagem de óxido de cariofileno (29,38%), atividade já descrita na literatura para esse componente. Óleo essencial extraído de folhas, cascas e hastes de *Annona squamosa* L. revelou a presença dos componentes majoritários α -pineno, limoneno, β -cubebeno, β -cariofileno, espatulenol, óxido de cariofileno e α -cadinol (THANG, 2012). Estudo do perfil químico do óleo essencial das folhas de *A. emarginata* revelou a presença de (*E*)-cariofileno-29.29%, (*Z*)-cariofileno-16.86%, γ -muuroleno-7.54%, α -pineno-13.86%, e triciclono-10.04% como substâncias majoritárias do óleo

(CAMPOS et al.,2014). Na família Annonaceae verificou-se a presença de óleo essencial nas folhas e também em outras partes da planta, incluindo cascas e raízes, conforme demonstrado por Boyom et al., (2011) e Muganza et al., (2012). Esses trabalhos demonstram que os óleos das Annonaceae apresentam variação dos constituintes, havendo, no entanto, alguns componentes majoritários que em diferentes espécies, também podem variar com as condições do ambiente, entre elas a nutrição mineral.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu/SP, em casa de vegetação tipo “Paddy Fan” com controle de temperatura, que foi mantida em $26^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$. As coordenadas geográficas são $48^{\circ}24'35''$ de longitude oeste e $22^{\circ}49'10''$ de latitude sul, a 800 m acima do nível do mar. As mudas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’ foram adquiridas no Núcleo de Produção de mudas de São Bento do Sapucaí, da CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica e Integrada) cidade de São Bento do Sapucaí, SP coordenadas geográficas $45^{\circ}44'11''$ longitude oeste e $22^{\circ}41'18''$ latitude sul a 874m acima do nível do mar.

As plantas tiveram suas raízes lavadas em água corrente e foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de seis litros, contendo solução nutritiva específica de cada tratamento, onde foram mantidas durante 4 meses para uniformizar seu crescimento, antes do início das avaliações.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial 4×5 , ou seja, quatro níveis de nitrogênio, avaliados em cinco épocas de colheita, 150, 164, 172, 192 e 206 dias após o transplante (DAT), de modo a cobrir parte do ciclo do vegetal.

Tabela 1: Tratamentos a que foram submetidas as plantas de *A. emarginata* cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon nº1, com diferentes níveis de nitrogênio fornecido.

Tratamentos [N]	Sais	Solução estoque (g.L ⁻¹)	Solução nutritiva (ml.L ⁻¹)	Solução nutritiva (mol.L ⁻¹)
T1: 157,5 mg.L ⁻¹	Macronutrientes			
	(M) KH ₂ PO ₄	136,08	0,75	0,75mmol.L ⁻¹
	(M) KNO ₃	101,10	3,75	3,75mmol.L ⁻¹
	(M) Ca(NO ₃) ₂	236,16	3,75	3,75mmol.L ⁻¹
	(M) Mg(SO ₄).7H ₂ O	246,50	1,50	1,50mmol.L ⁻¹
	Solução Micronutrientes			
	H ₃ BO ₃	2,86		
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	0,75	56,5μmol.L ⁻¹
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22		
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08		
	H ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,02		
	Solução de Fe			
	EDTA Bissódico (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O)	26,10	0,75	160μmol.L ⁻¹
	FeSO ₄ .7H ₂ O	24,90		
T2: 118,12 mg.L ⁻¹	Macronutrientes			
	(M) KH ₂ PO ₄	136,08	0,75	0,75mmol.L ⁻¹
	(M) KNO ₃	101,10	2,80	2,80mmol.L ⁻¹
	(M) Ca(NO ₃) ₂	236,16	2,80	2,80mmol.L ⁻¹
	(M) Mg(SO ₄).7H ₂ O	246,50	1,50	1,50mmol.L ⁻¹
	(0,5M) K ₂ SO ₄	87,13	0,92	0,92mmol.L ⁻¹
	Solução Micronutrientes		Idem T1	
	Solução de Fe-EDTA		Idem T1	
	Macronutrientes			
	(M) KH ₂ PO ₄	136,08	0,75	0,75mmol.L ⁻¹
T3: 78,75mg.L ⁻¹	(M) KNO ₃	101,10	1,90	1,90mmol.L ⁻¹
	(M) Ca(NO ₃) ₂	236,16	1,90	1,9 mmol.L ⁻¹
	(M) Mg(SO ₄).7H ₂ O	246,50	1,50	1,50mmol.L ⁻¹
	(0,5M) K ₂ SO ₄	87,13	1,82	1,82mmol.L ⁻¹
	(0,01M) CaSO ₄	1,36	6000,00	62, mmol.L ⁻¹
	Solução Micronutrientes		Idem T1	
	Solução de Fe-EDTA		Idem T1	
	Macronutrientes			
	(M) KH ₂ PO ₄	136,08	0,75	0,75mmol.L ⁻¹
	(M) KNO ₃	101,10	0,94	0,94mmol.L ⁻¹
T4: 39,37mg.L ⁻¹	(M) Ca(NO ₃) ₂	236,16	0,94	0,94mmol.L ⁻¹
	(M) Mg(SO ₄).7H ₂ O	246,50	1,50	1,50mmol.L ⁻¹
	(0,5M) K ₂ SO ₄	87,13	2,72	2,72mmol.L ⁻¹
	(0,01M) CaSO ₄	1,36	15000,00	166,6mmol.L ⁻¹
	Solução Micronutrientes		Idem T1	
	Solução de Fe-EDTA		Idem T1	
	Macronutrientes			
	(M) KH ₂ PO ₄	136,08	0,75	0,75mmol.L ⁻¹
	(M) KNO ₃	101,10	0,94	0,94mmol.L ⁻¹
	(M) Ca(NO ₃) ₂	236,16	0,94	0,94mmol.L ⁻¹

As plantas foram cultivadas em solução nutritiva nº 1 de Hoagland e Arnon (1950) contendo 157,5 mg L⁻¹ de N e modificada para fornecimento de níveis de nitrogênio iguais a 118,12; 78,75 e 39,37 mg L⁻¹ (Tabela 2), onde permaneceram até as datas de colheita. Dessa forma, as plantas foram cultivadas em quatro tratamentos T1 composto por 157,5 mg L⁻¹ N (testemunha); T2 constituído por 118,12 mg L⁻¹ N; T3 com 78,75 mg L⁻¹; e T4 com 39,37 mg L⁻¹ N.

Todas as soluções foram continuamente arejadas, utilizando-se um soprador rotatório e renovadas a cada duas semanas (DANTAS et al., 1979). Sempre que necessário, o volume de solução dos vasos foi completado com água deionizada, mantendo o volume de 6 L. O controle diário do pH da solução nutritiva será feito com a utilização de um medidor de pH e ajustado para 5,5 - 6,5, faixa ideal para o desenvolvimento da maioria das espécies, de acordo com as preconizações de Taiz e Zeiger (2013). A condutividade elétrica da solução foi controlada, com a utilização de um condutivímetro e mantida entre 1,5 - 2,5 mS cm⁻¹, de acordo com as especificações de Carmello (1992).

Em cada época de colheita foram avaliadas as trocas gasosas, nitrato redutase, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, área foliar, matéria seca das lâminas foliares e total das plantas e a composição química dos compostos voláteis foliares.

Variáveis avaliadas

Trocas gasosas

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas utilizando-se equipamento com sistema aberto portátil de fotossíntese com analisador de CO₂ e vapor d'água por radiação infravermelha ("*Infra Red Gas Analyser* – IRGA", modelo LI-6400, Li-Cor Inc., NE, USA). Tais medidas foram estimadas a partir da diferença entre a concentração de CO₂ e vapor d'água do ar da referência (valor presente na câmara sem a folha) e da amostra (valor com a folha presente na câmara), obtendo-se as concentrações de vapor d'água e CO₂ que foram liberadas (transpiração – vapor d'água) e assimiladas (assimilação de CO₂) pelos estômatos das folhas.

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas entre 09:00 e 11:00 horas da manhã, nas mesmas épocas de colheita, selecionando-se uma planta de cada repetição, de cada tratamento, nas quais foram escolhidas e padronizadas as 2^{as} ou 3^{as} folhas, com o limbo completamente expandido. As características de trocas gasosas avaliadas foram: taxa de assimilação de CO₂ (A_{net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol de vapor d'água m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ na folha (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar). Essas variáveis foram calculadas pelo programa de análise de dados do equipamento medidor de fotossíntese, que utiliza a equação geral de trocas gasosas de Von Caemmerer e Farquhar (1981). A eficiência de uso da água (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O}^{-1})$) foi determinada por meio da relação entre assimilação de CO₂ e taxa de transpiração (A_{net}/E); já a eficiência instantânea de carboxilação da enzima ribulose 1,5-difosfato carboxilase (Rubisco) foi calculada pela relação da taxa de assimilação de CO₂ e concentração interna de CO₂ na folha (A_{net}/C_i , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), ambas conforme descrito por Zhang et al. (2001).

O potencial fotossintético foi avaliado por meio de curvas de resposta ao CO₂ (curvas A_{net}/C_i). As avaliações foram realizadas no período da manhã entre 7 e 11 horas, em folhas totalmente expandidas, sendo utilizadas quatro repetições por concentração de nitrogênio, dos 186 aos 189 DAT, sendo avaliada uma repetição por tratamento, por dia.

As concentrações de CO₂ variaram entre 0 a 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, sendo realizado, primeiramente, decréscimo da concentração de CO₂, começando em 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ e finalizando em 0 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, com intervalos de 50 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂. Em seguida, foi realizado o acréscimo de CO₂, começando em 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ e finalizando em 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, com intervalos de 200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂. Essas concentrações foram estipuladas devido à inexistência de trabalhos com *A. emarginata*, que defina a concentração de CO₂ responsável pela assimilação máxima. As medidas foram realizadas sob irradiância saturante de 1,200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fótons, de acordo com trabalhos anteriores ainda não publicados, para que as reações não estivessem limitadas pela luz.

Após as avaliações, as curvas foram ajustadas conforme modelo proposto por Sharkey et al. (2007), tendo-se calculado a taxa máxima de carboxilação da Ribulose 1,5-bifosfato (V_{cmax} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a taxa de transporte

fotossintético de elétrons (J , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o uso de triose fosfato (TPU), a taxa respiratória (Rd^* , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a condutância do mesofilo (g_m^* , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Atividade da nitrato redutase

Foram retiradas folhas totalmente expandidas, coletadas das 9h às 11h e acondicionadas em sacos plásticos, embrulhadas em papel alumínio e colocadas sobre gelo. A seguir, esse material vegetal foi conduzido ao laboratório para a determinação da atividade da nitrato redutase.

Foi utilizado o método proposto por Jaworski (1971), no qual 200 mg de material vegetal (segmento foliares) foram infiltrados à vácuo, em tubos contendo 10mL de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH de 7,0), acrescido de 1% de N-propanol. A seguir, esses tubos passaram por um período de uma hora de incubação em banho-maria a 30°C, no escuro. Após esse período, foi transferida uma alíquota de 1mL dessa solução para tubos de ensaio limpos, aos quais foram acrescentados 1mL de solução sulfanilamida (1%) e 1mL de solução N-Naftil (0,02%), e, depois, levados para incubar em banho-maria a 30°C, no escuro, por 15 minutos. Passado esse tempo, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm. Foi utilizada uma solução de nitrito 10mM para a confecção da curva padrão. Os resultados foram expressos em $\text{nM NO}_2 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de matéria fresca.

Atividades de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica

Foram retiradas folhas totalmente expandidas, coletadas das 9h às 11h e acondicionadas em sacos plásticos, embrulhadas em papel alumínio e colocadas sobre gelo. A seguir, esse material vegetal foi congelado em nitrogênio líquido para imediata paralisação das reações metabólicas. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C, para posterior análise das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica.

O extrato enzimático para determinação da superóxido dismutase, peroxidase e catalase foi obtido segundo a metodologia proposta por Kar; Mishra (1976). Foram utilizados 200mg de massa foliar fresca congelada e macerada em nitrogênio líquido. A seguir, esse material foi homogeneizado em 4ml de tampão

fosfato de potássio (0,1M, pH 6,8) gelado e o extrato foi centrifugado a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram separados em microtubos e congelados em freezer a -20°C para posterior avaliação.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada pela metodologia descrita por Peixoto et al. (1999). A reação foi preparada em ambiente sem luz, sendo composta por 50µL de extrato enzimático e 2950µL de solução tampão fosfato de potássio (50 mmol L⁻¹, pH 7,8) contendo metionina (13 mmol L⁻¹), cloreto de azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT, 75 µmol L⁻¹) riboflavina (2 µmol L⁻¹) e EDTA (100 nmol L⁻¹), totalizando 3000µL. A reação foi conduzida sob a luz por 5 minutos e à temperatura ambiente. A inibição da redução fotoquímica do NBT foi avaliada em espectrofotômetro a 560 nm. O NBT quando exposto a luz é convertido em formazan por ação dos radicais superóxido (O₂^{-*}), substrato da SOD. Deste modo, quanto maior a absorbância, maior a concentração de formazan, o que refere maior concentração de radicais O₂^{-*}, indicando menor atividade da SOD. Uma unidade de SOD (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir, em 50%, a fotorredução do NBT e a atividade específica da enzima foi expressa em U mg⁻¹ de proteína.

A atividade da enzima peroxidase (PODs, EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método espectrofotométrico proposto por Teisseire e Guy (2000), sendo utilizado 30µL do extrato enzimático, 500µL de tampão fosfato de potássio (50 mmol L⁻¹, pH 6,5), 250µL de pirogalol (1,2,3-benzenotriol, 20 mmol L⁻¹) e 220µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 5 mmol L⁻¹), totalizando 1000µL. A reação foi mantida por 5 minutos e a formação de purpurogalina foi avaliada em espectrofotômetro, cuja leitura foi realizada a 430 nm. O calculo da atividade específica da enzima foi feito por meio do seu coeficiente de extinção molar (2,5 mmol L⁻¹ cm⁻¹) e a atividade foi expressa em µmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada por metodologia de Peixoto et al. (1999). Foram utilizados 100µL do extrato enzimático e 1900µL de solução tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,0, suplementado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 12,5 mmol L⁻¹), totalizando 2000µL. A reação foi mantida por 80 segundos, com leituras realizadas no início e ao seu final em espectrofotômetro a 240 nm para observação do decréscimo da absorbância. O calculo da sua atividade específica foi feito utilizando o coeficiente de extinção molar do H₂O₂

(39,4 mmol L⁻¹ cm⁻¹) e a atividade foi expressa em nmol de H₂O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A quantificação das proteínas solúveis totais do extrato foi determinada de acordo com metodologia proposta por Bradford (1976). A reação foi composta por 100μL de extrato enzimático e 5000μL de reativo de Bradford, composto por Coomassie Brilliant Blue G- 250 0,01% (m/v), etanol 4,7% (m/v) e ácido fosfórico 8,5% (m/v), a qual foi conduzida por 15 minutos, sendo a sua leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Para a realização da curva padrão foi diluída 100 mg de caseína em 50ml de solução NaOH 0,5 mol L⁻¹ e o volume foi completado com água deionizada para 100ml. A partir dessa solução montou-se a curva padrão para a quantificação das proteínas.

A peroxidação lipídica foi determinada por metodologia de Heath e Packer (1968) apud Rama Devi e Prasad (1998). Utilizou-se 200 mg de massa foliar fresca congelada e macerada em nitrogênio líquido para o preparo do homogeneizado constituído por 5 ml da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) 10%. Esse extrato foi incubado em banho-maria a 90°C por 60 minutos e após o seu resfriamento foi submetido à centrifugação a 10000 x g por 15 minutos à temperatura ambiente (25°C). O sobrenadante foi coletado e as absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro a 560 e 600 nm. A diferença de medidas foi utilizada para calcular o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (155 mmol L⁻¹ cm⁻¹) e os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído g⁻¹ de matéria fresca.

Análise de crescimento

As plantas foram separadas em lâminas foliares, caules mais pecíolos e raízes. O diâmetro do caule foi medido com o auxílio de paquímetro digital (mm). As lâminas foliares foram imediatamente submetidas à determinação da área foliar em dm², com auxílio do integralizador de área foliar LI 3100 da LI-COR. A seguir, todo o material foi acondicionado em sacos de papel, etiquetado e colocado para secar em estufa de circulação forçada de ar, a 40°C, até obtenção de matéria seca constante. Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica Ohaus tipo Analytical Standard com sensibilidade de até 0,1 mg para determinação da matéria seca e, após a pesagem.

A área foliar (AF) foi definida como a somatória da área de todas as lâminas foliares da planta, em decímetros quadrados.

A matéria seca das lâminas foliares (MSF) foi definida como o peso de todas as folhas da planta, expresso em gramas.

A matéria seca total (MST) correspondeu à soma das matérias secas de folhas, caules e raízes, em cada época de colheita, expressa em gramas.

Esta razão de área foliar (RAF) que expressa a área foliar útil para fotossíntese (BENINCASA, 2003) foi obtida a partir de valores instantâneos de área foliar (AF), responsável pela interceptação de energia luminosa, e massa seca total (MST), resultado da fotossíntese, segundo a equação:

$$RAF (dm^2 g^{-1}) = AF / MST$$

A área foliar específica (AFE) reflete o inverso da espessura da folha (BENINCASA, 2003) e foi obtida pela razão entre a área foliar (AF) e a massa seca de folhas (MSF):

$$AFE (dm^2 g^{-1}) = AF / MSF$$

O peso específico da folha (PEF) reflete a espessura da folha (BENINCASA, 2003) e foi obtida pelo inverso da área foliar específica (AFE):

$$PEF (dm^2 g^{-1}) = 1 / AFE$$

A razão de massa foliar (RMF) expressa a fração de matéria seca não exportada das folhas para o resto da planta. A exportação de material da folha pode ser uma característica genética estando sob influência de variáveis ambientais (BENINCASA, 2003). Esta variável foi calculada pela relação entre massa seca da folha (MSF) e a massa seca total (MST) da planta.

$$RMF = MSF / MST$$

A taxa assimilatória líquida (TAL) expressa a taxa de fotossíntese líquida, em termos de massa seca produzida, em gramas, por decímetro quadrado de área foliar, por unidade de tempo (BENINCASA, 2003), foi obtida pela seguinte equação:

$$TAL (g/dm^2 \cdot dia) = \frac{(b+2ct).a.e^{(bt+ct^2)}}{a_1.e^{(b_1+c_1t^2)}}$$

A taxa de crescimento relativo (TCR) de uma planta ou de qualquer órgão da planta é função de tamanho inicial, isto é, o aumento em gramas, no caso de massa seca, está relacionado ao peso de massa seca no instante em que se inicia o período de observação (BENINCASA, 2003). Essa taxa foi calculada pela equação:

a, b e c são constantes e t é o tempo.

$$TCR (g/g \cdot dia) = d \ln \frac{a.e^{(bt+ct^2)}}{dt}$$

A distribuição de massa seca nos diferentes órgãos reflete a porcentagem de massa seca de cada órgão em relação à massa seca total, nas diferentes colheitas. Essa variável permite inferir a translocação orgânica (BENINCASA, 2003).

Composição química de voláteis foliares

Após secagem as lâminas foliares foram utilizadas para a extração dos voláteis nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos para determinação de seu perfil químico no Laboratório de Fitoquímica do Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas, em Campinas/SP.

As folhas de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘araticum-de-terra-fria’ foram secas em estufa de aeração forçada, a temperatura constante de 40°C até obtenção de matéria seca constante. Tal secagem visou impedir a deterioração do material por meio da redução do teor de água uma vez que, a desidratação atua diminuindo a atividade das enzimas, o que permite a conservação da planta por mais

tempo (SILVA; CASALI, 2000). Além disso, a eliminação de água aumenta o percentual de princípios ativos em relação à massa. A captura dos voláteis foi realizada por meio de microextração em fase sólida em modo headspace (HS-SPME) com: *SPME Fiber Assembly 75 um CarboxenTM – PDMS for Manual Holder-SUPELCO*. Para tanto, 250 mg de massa seca de folhas foram acondicionadas em frasco de vidro de 10 ml. A seguir, 5 ml de água destilada foram adicionados e o frasco foi vedado, utilizando-se tampa de rosca. A solução foi aquecida em banho-maria durante uma hora em temperatura igual a 90°C. Após esse período e depois do frasco ter sido retirado do banho-maria, a fibra foi introduzida para a captura dos voláteis durante 15 minutos, que oportunamente foi levada ao CG-EM para sua identificação dos voláteis.

A composição química dos componentes voláteis extraídos das folhas foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), em equipamento Shimadzu modelo QP-5000 dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e gás de arraste Hélio (fluxo 1,0 mL min⁻¹). Para a identificação das substâncias, os seus espectros de massas foram comparados aos do banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 Libr.), determinando-se o índice de retenção calculado (IRC), comparando os mesmos com a literatura (ADAMS, 2007).

$$IRC = 100 \times N \times \left(\frac{tR_{subst} - tR_{hid\ ant}}{tR_{hid\ post} - tR_{hid\ ant}} \right) + 100 \times C_{ant}$$

N: intervalo entre os hidrocarbonetos (1)

tR_{subst}: tempo de retenção da substância

tR_{hid ant}: tempo de retenção do hidrocarboneto anterior

tR_{hid post}: tempo de retenção do hidrocarboneto posterior

C_{ant}: número de carbonos do hidrocarboneto anterior

Análise estatística

As médias de assimilação de CO₂, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂ e eficiência de uso da água foram expressas em gráfico de barras acompanhadas de seus desvios padrão, uma vez que não apresentaram homogeneidade. A velocidade máxima de carboxilação, taxa de transporte de elétrons,

condutância do mesófilo, limitação do uso pela triose fosfato e taxa de respiração foram submetidas à análise de variância e ao teste Tukey, utilizando-se o nível de 5% de significância (ZAR, 2010).

A atividade das enzimas antioxidantes, nitrato redutase e peroxidação lipídica foram avaliados segundo o fator colheita por meio de análise de regressão e os tratamentos foram submetidas a análise de variância, sendo suas médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (ZAR, 2010). Entre as enzimas antioxidantes, os resultados da catalase foram submetidos à transformação logarítmica.

Área foliar, diâmetro de haste, massa seca de folha, caule, raiz e total, foram avaliados segundo o fator colheita por meio de análise de regressão e os tratamentos foram submetidas a análise de variância, sendo suas médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (ZAR, 2010).

Para se proceder à estimativa dos índices fisiológicos razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), taxa assimilatória líquida (TAL) e taxa de crescimento relativo (TCR), distribuição de massa seca nos diferentes órgãos e razão de massa foliar (RMF), avaliou-se o fator colheita, ou seja, idade das plantas, por meio de análise de regressão e as curvas foram ajustadas segundo a equação que representa o crescimento da *A. emarginata*, conforme estudos prévios realizados por Baron et al.,(2013) (ZAR, 2010).

A composição química de voláteis foi submetida à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, segundo especificações de Zar (2010), utilizando-se o nível de 5% de significância.

A homogeneidade das variâncias foi testada usando-se o teste de Levene (ZAR, 2010). Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS, Versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Resultados

Trocas gasosas

A temperatura e umidade relativas determinadas durante as avaliações de trocas gasosas na casa de vegetação estão apresentados na tabela 2.

As plantas submetidas a 157,5 mg L⁻¹ de N apresentaram as menores taxas de assimilação de CO₂ (Figura 2A), condutância estomática (g_s) (Figura 2B), taxa transpiratória (E) (Figura 2C), eficiência de carboxilação (A_{net}/C_i) (Figura 2E) e eficiência do uso da água (EUA) (Figura 2D).

As plantas submetidas aos tratamentos contendo 118,12 mg L⁻¹ e 78,75 mg L⁻¹ de N revelaram maior taxas de assimilação de CO₂ (Figura 2A), condutância estomática (Figura 2B), transpiração (Figura 2C) e eficiência de carboxilação (Figura 2E). Menor eficiência do uso da água foi observada (Figura 2D).

As menores taxa de assimilação de CO₂ (Figura 2A), condutância estomática (Figura 2B), transpiração (Figura 2C) e eficiência de carboxilação da Rubisco (Figuras 2E), foram reveladas pelas plantas cultivadas com 39,37 mg L⁻¹ de N, que apresentaram melhor eficiência do uso da água (Figura 2D).

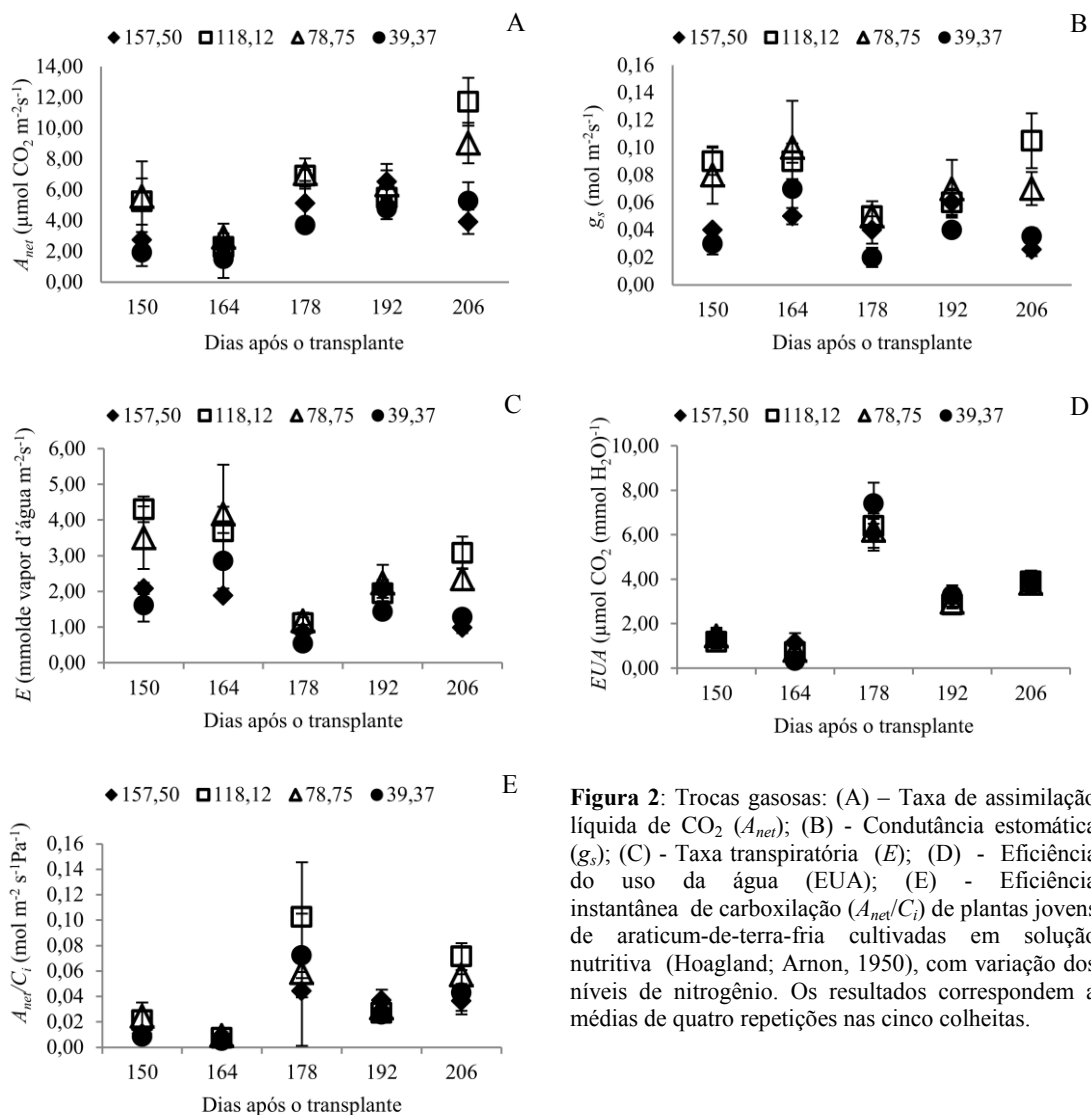


Tabela 2: Temperatura do ar (°C), umidade relativa (%) e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), nas diferentes épocas de colheita.

Dias após o transplante	Temperatura do ar (°C)	Umidade Relativa (%)	Densidade de Fluxo de Fótons Fotossinteticamente Ativos ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
150	38,69 ± 0,40	30,68 ± 0,64	879,77 ± 47,68
164	35,43 ± 1,58	32,50 ± 1,57	1036,05 ± 88,04
178	28,19 ± 0,63	43,91 ± 1,27	773,97 ± 65,56
192	32,43 ± 0,30	29,09 ± 1,53	804,46 ± 41,65
206	32,84 ± 0,36	37,47 ± 0,28	759,78 ± 63,25

A velocidade máxima de carboxilação (V_{cmax}) (Figuras 3A) e taxa respiratória (Rd^*) decresceram com a diminuição dos níveis de nitrogênio (Figura 3E).

A taxa de transporte de elétrons (J), condutância do mesófilo (g_m) e limitação pelo uso de triose fosfato (TPU) não variaram entre os tratamentos com diferentes níveis de nitrogênio (Figuras 3B, C e D).

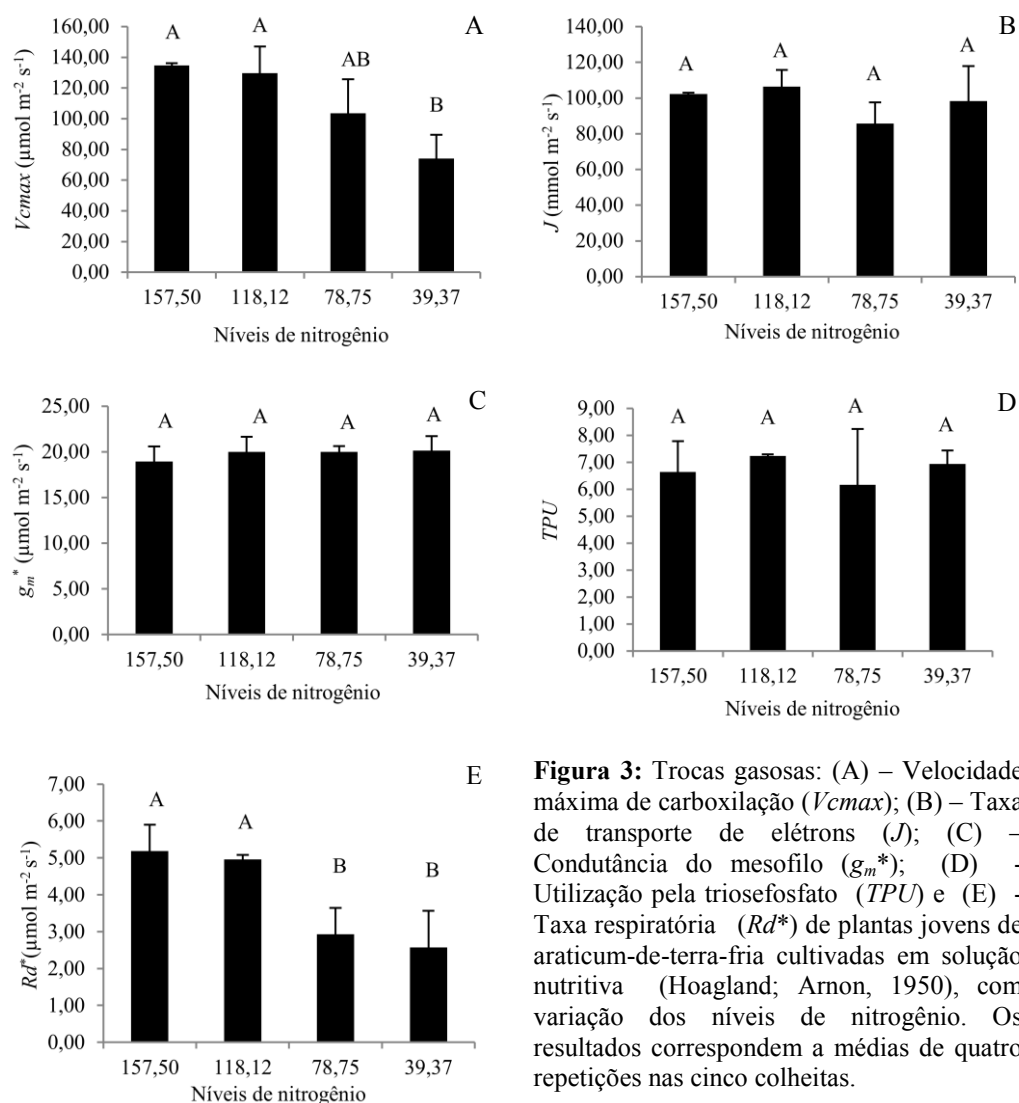


Figura 3: Trocas gasosas: (A) – Velocidade máxima de carboxilação (V_{cmax}); (B) – Taxa de transporte de elétrons (J); (C) – Condutância do mesófilo (g_m^*); (D) – Utilização pela triosefosfato (TPU) e (E) – Taxa respiratória (Rd^*) de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivadas em solução nutritiva (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio. Os resultados correspondem a médias de quatro repetições nas cinco colheitas.

Atividade da nitrato redutase

A atividade da nitrato redutase foi crescente ao longo do tempo nas plantas cultivadas com 39,37 e 118,12 mg L⁻¹ de N e variou naquelas submetidas a 78,75 e 157,5 mg L⁻¹ de N, onde suas atividades não diferiram (Figura 4; Tabela 3). No entanto, cabe ressaltar que as atividade da nitrato redutase das plantas cultivadas com 39,37 mg L⁻¹ de N apresentou em seu ajuste matemático uma tendência crescente, entretanto, sua atividade foi menor que a das plantas submetidas a 78,75; 118,12 e 157,5 mg L⁻¹ de N aos 164 e 192 DAT.

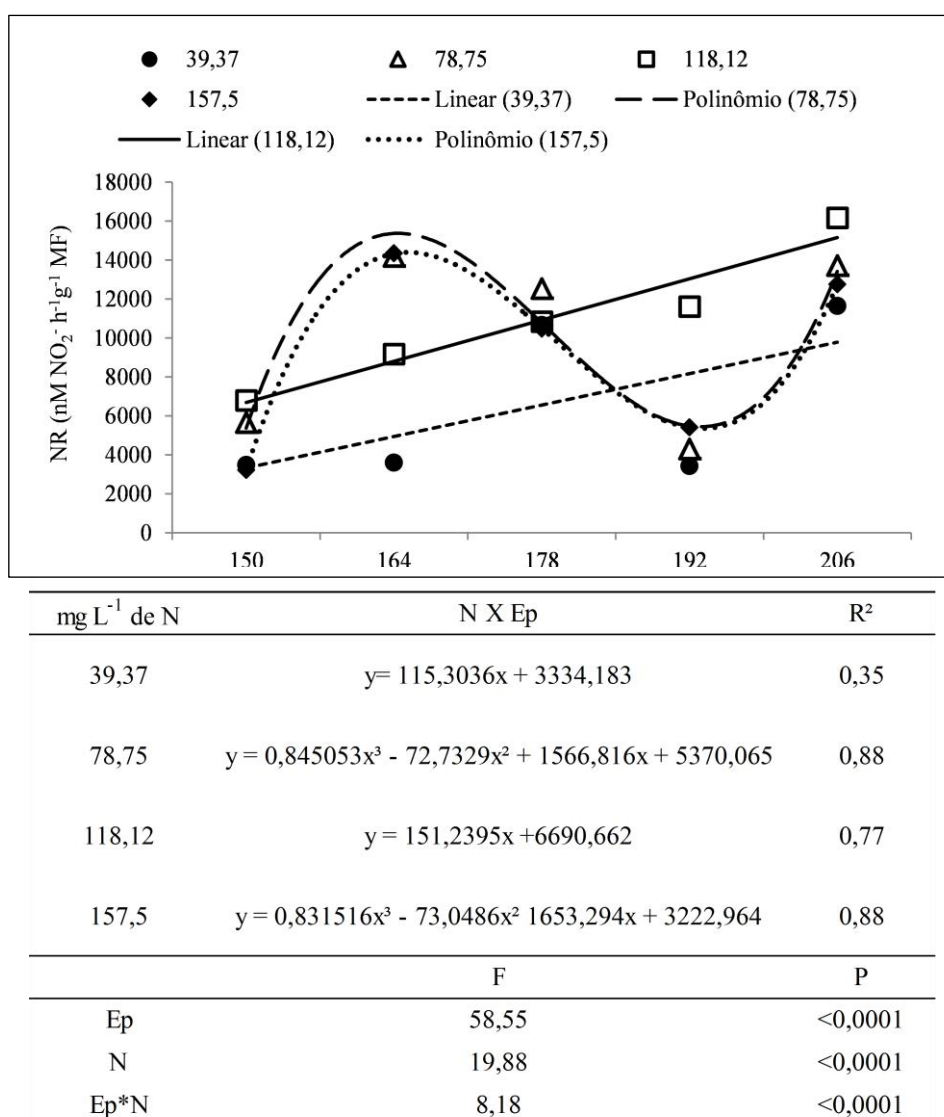


Figura 4: Atividade da enzima Nitrato redutase de plantas jovens de araticum-de-terra-friacultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados correspondem as médias de quatro repetições nas cinco colheitas.

Tabela 3: Valores médios da atividade da nitrato redutase de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, em diferentes épocas de colheita.

Dias após o transplante	NR (nM NO ₂ ⁻ h ⁻¹ g ⁻¹ MF)			
	mg L ⁻¹ de N			
	39,37	78,75	118,12	157,5
150	3480,45 A	5664,89 A	6806,26 A	3220,56 A
164	3603,07 C	14189,35 A	9182,03 B	14342,84 A
178	10664,11 A	12537,88 A	10844,74 A	10484,15 A
192	3425,08 C	4304,40 BC	11619,53 A	5418,61 B
206	11640,7 A	13720,90 A	16174,27 A	12752,26 A

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Atividade das Enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica

A atividade da SOD aumentou aos 192 DAT nas plantas submetidas aos diferentes níveis de nitrogênio, sendo o maior pico revelado pelas cultivadas com 157,5 mg L⁻¹ de N quando comparado com as plantas submetidas a 39,37 e 118,12 mg L⁻¹ de N e o menor pelas nutridas com 118,12 mg L⁻¹ de N quando comparadas com as nutridas com 78,75 e 157,5 mg L⁻¹ de N (Figura 5; Tabela 4).

As plantas tratadas com 39,37; 118,12 e 157,5 mg L⁻¹ de N apresentaram curvas com ajustes semelhantes para POD (Figura 6; Tabela 4), com pico de atividade aos 150 DAT para 157,5 mg L⁻¹ de N e aos 192 DAT para as concentrações de 39,37 e 118,12 mg L⁻¹ de N. Já as plantas cultivadas com 78,75 mg L⁻¹ de N apresentaram padrão decrescente de atividade dessa enzima.

A atividade da catalase manteve-se constante nas plantas cultivadas com todos os níveis de nitrogênio até o 178 DAT. Maiores atividade foram observadas aos 192 DAT nas plantas nutridas com 39,37 e 157,5 mg L⁻¹ de N, onde o menor nível apresentou maior atividade que as concentrações intermediárias 78,75; 118,12 mg L⁻¹ de N (Figura 7; Tabela 4).

A peroxidação lipídica não apresentou variação nos diferentes níveis de nitrogênio (Figura 8; Tabela 4).

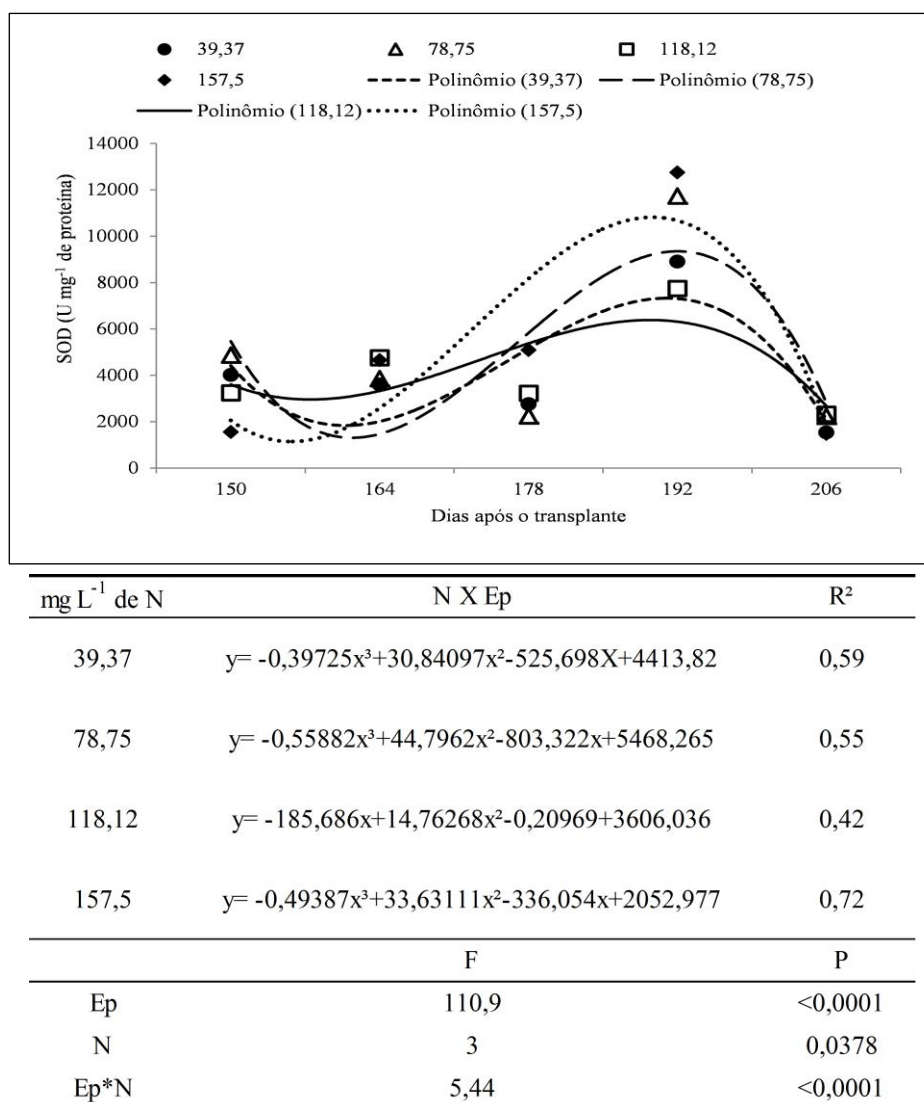


Figura 5: Atividade da enzima Superóxido dismutase de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados correspondem as medias de quatro repetições nas cinco colheitas.

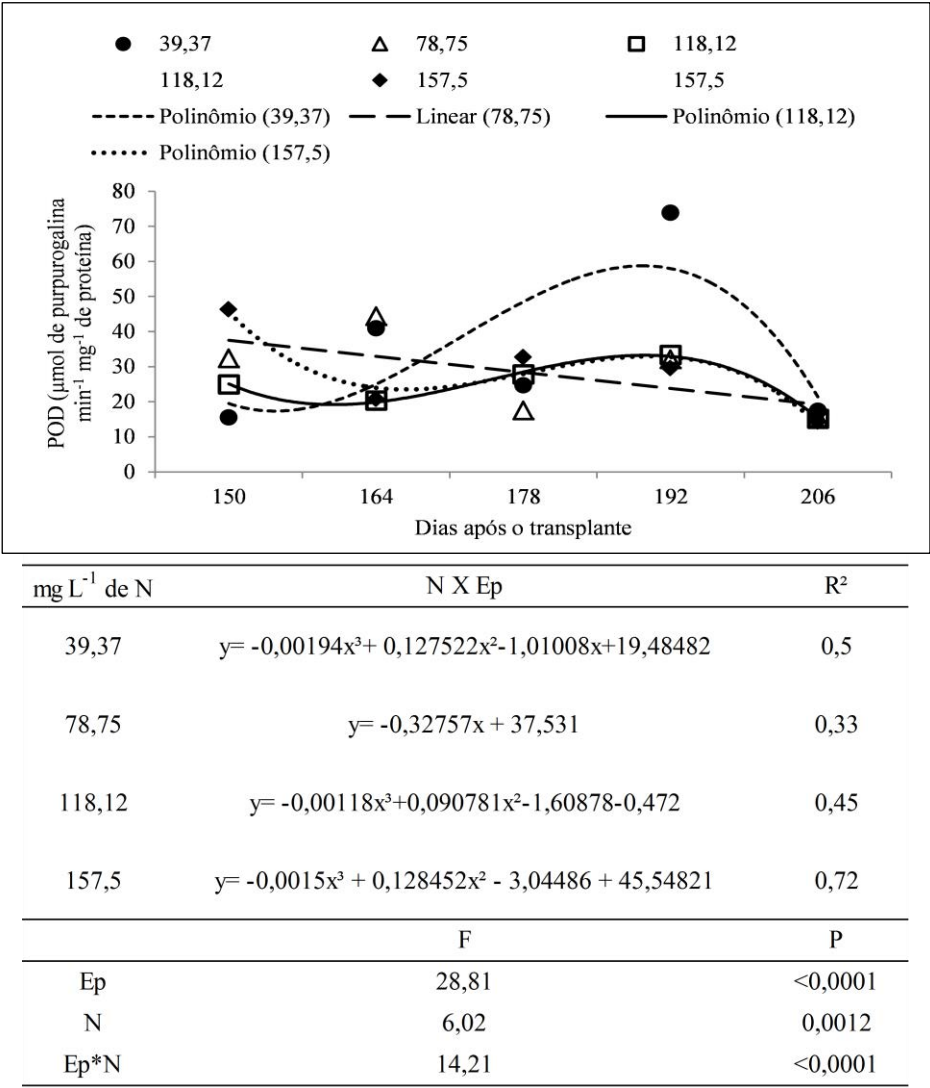


Figura 6: Atividade da enzima Peroxidase de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados correspondem as medias de quatro repetições nas cinco colheitas.

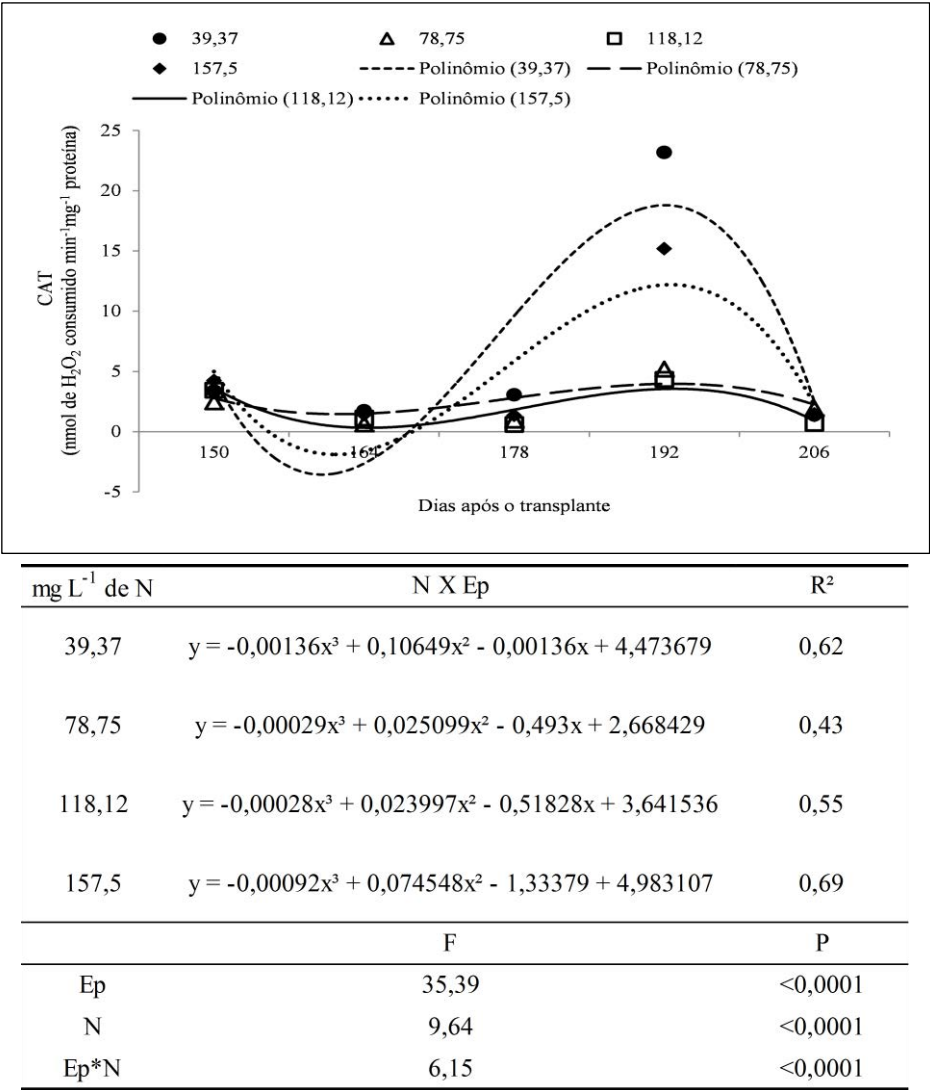
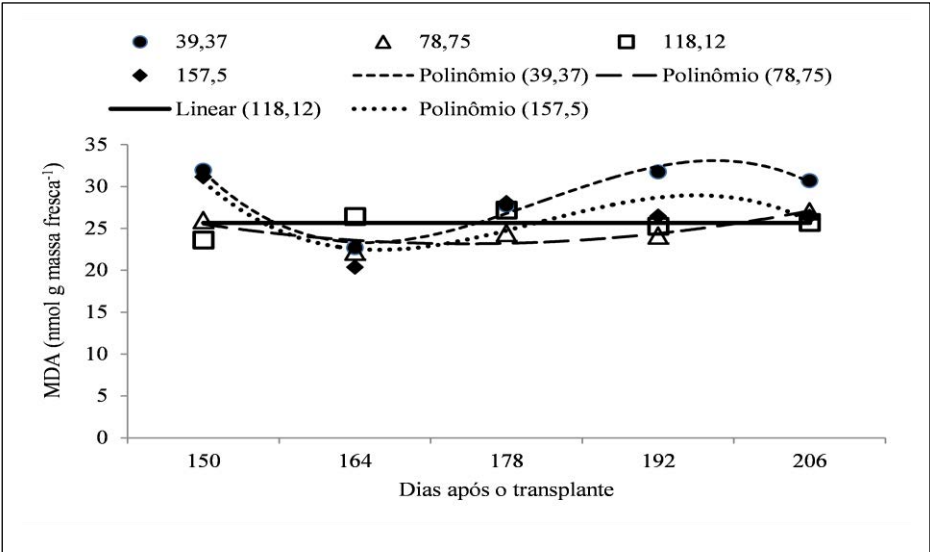


Figura 7: Atividade da enzima Catalase de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados, com ajuste logarítmico, correspondem as medias de quatro repetições nas cinco colheitas.



mg L ⁻¹ de N		N X Ep	R ²
39,37	y= -0,00059x ³ +0,055001x ² - 1,25731x + 31,77536		0,69
78,75	y= 0,003935x ² -0,19166+25,4975		0,51
118,12	NS		-
157,5	y = -0,00051x ³ + 0,047705x ² - 1,141x -1,6		0,46
		F	P
Ep		35,39	<0,0001
N		9,64	<0,0001
Ep*N		6,15	<0,0001

Figura 8: Atividade da Peroxidação lipídica (expresso pela formação de malonaldeído) de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, (A) regressão entre as colheitas. Os resultados correspondem as medias de quatro repetições nas cinco colheitas.

Tabela 4: Valores médios da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase e peroxidação de lipídios de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio, em diferentes épocas de colheita.

Dias após o transplante	mg L ⁻¹ de N			
	39,37	78,75	118,12	157,5
SOD (U mg ⁻¹ de proteína)				
150	4014,64 AB	4872,12 A	3247,84 AB	1537,75 B
164	3605,56 A	3853,01 A	4757,33 A	4645,64 A
178	2758,2 A	2251,5 A	3228,43 A	5077,47 A
192	8903,61 BC	11732,26 AB	7745,84 C	12735 A
206	1530,28 A	2229,85 A	2320,18 A	1454,3 A
CAT (nmol de H ₂ O ₂ consumido min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)				
150	3,38 A	2,48 A	3,44 A	4,23 A
164	1,73 A	0,63 A	1,13 A	1,39 A
178	3,05 A	0,95 A	0,61 A	1,35 A
192	23,17 A	5,2 BC	4,35 C	15,19 AB
206	1,38 A	1,93 A	0,7 A	1,47 A
POD (μmol de purpurogalina min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)				
150	15,51 B	32,34 AB	24,98 B	46,34 A
164	40,89 A	44,34 A	20,35 B	20,78 B
178	24,67 A	17,49 A	27,8 A	32,74 A
192	73,86 A	32,08 BC	33,4 B	29,57 C
206	17,43 A	15,54 A	15,17 A	14,36 A
MDA (nmol g massa fresca ⁻¹)				
150	31,94 A	25,98 A	23,62 A	31,15 A
164	22,68 A	22,21 A	26,42 A	20,35 A
178	27,76 A	24,43 A	27,20 A	28,06 A
192	31,74 A	24,14 A	25,27 A	26,47 A
206	30,68 A	27,02 A	25,72 A	26,43 A

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Massa seca de folha, caule, raiz e total das plantas

As plantas submetidas aos maiores níveis de nitrogênio, 78,75; 118,12 e 157,5 mg L⁻¹ de N, apresentaram aumento contínuo da massa seca de folha, caule, raiz e total (Figuras 9A, B, C e D; Figura 10 e Tabela 5), exceção feita para a matéria seca de raiz das plantas submetidas a 78,75 mg L⁻¹ de N, que mostraram leve decréscimo na última colheita e para a matéria seca de folha que se manteve constante.

No nível de 39,37 mg L⁻¹ de N as plantas apresentaram aumento das massas secas de seus diferentes órgãos até 178 DAT, diminuindo a seguir.

Deve ser ressaltada a intensa brotação de ramos laterais desenvolvidos nas bases de pecíolos de folhas ainda presentes nas plantas submetidas às duas maiores concentrações de nitrogênio iguais a 118,12 e 157,5 mg L⁻¹ de N. Nessas plantas podem ser observados ápices caulinares com ramos laterais e folhas pequenas que se destacavam facilmente com simples manuseio dos vasos. Também em seus sistemas radiculares foram observados desenvolvimento de numerosas raízes laterais (Figuras 9A, B, C e D; Figura 10 e Tabela 5).

Área Foliar

As plantas cultivadas com os dois maiores níveis de nitrogênio e iguais a 118,12 e 157,5 mg L⁻¹ de N apresentaram as menores áreas foliares, crescentes até 192 DAT. No maior nível de N as plantas revelaram menor área foliar (Figura 9E e Tabela 5). As plantas submetidas a 78,75 mg L⁻¹ de N mostram aumento de área foliar semelhante ao 118,12 mg L⁻¹ de N, exceto a partir dos 192 DAT e que ela continuou aumentando. No nível de 39,37 mg L⁻¹ de N as plantas apresentaram aumento da área foliar até os órgãos até 178 DAT, diminuindo a seguir

Diâmetro de caule

De maneira geral, as plantas submetidas aos diferentes tratamentos apresentaram diâmetro de caule crescente ao longo do tempo, exceção feita às plantas submetidas ao menor nível, 39,37 mg L⁻¹ de N, cujo diâmetro diminuiu a partir dos 178 DAT (Figura 9F). As plantas cultivadas com 118,12 mg L⁻¹ de N apresentaram maior diâmetro de caule aos 164 DAT (Tabela 5).

Tabela 5: Valores médios de massa seca folha, massa seca de caule, massa seca de raiz, massa seca total, diâmetro de caule e área foliar de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio.

Dias após o transplante	mg L ⁻¹ de N			
	39,37	78,75	118,12	157,5
Massa seca foliar (g)				
150	1,25 A	1,09 A	0,63 A	0,54 A
164	2,84 A	2,61 A	2,38 A	0,57 B
178	2,28 A	2,46 A	1,69 A	3,31 A
192	3,23 A	2,24 A	3,75 A	2,96 A
206	2,46 A	2,79 A	2,83 A	4,42 A
Massa seca de caule (g)				
150	1,00 A	0,96 A	0,62 A	0,57 A
164	4,66 A	1,88 BC	2,86 AB	0,59 C
178	3,88 A	3,51 A	2,51 A	7,09 A
192	4,69 A	3,31 A	4,12 A	4,28 A
206	3,04 B	6,09 A	6,21 A	9,70 A
Massa seca de raiz (g)				
150	0,89 A	0,89 A	0,52 A	0,55 A
164	2,88 A	1,79 AB	2,58 A	0,53 B
178	2,85 A	2,98 A	2,15 A	5,86 A
192	3,75 A	3,05 A	4,64 A	3,78 AB
206	2,21 B	2,99 AB	4,57 AB	5,35 A
Massa total (g)				
150	3,14 A	2,94 A	1,77 A	1,65 A
164	10,39 A	6,28 B	7,82 AB	1,68 C
178	9,01 A	8,95 A	6,35 A	5,86 A
192	11,67 A	8,59 A	10,33 A	11,02 A
206	7,71 B	11,88 AB	13,61 AB	19,46 A
Diâmetro do caule (mm)				
150	3,86 A	4,34 A	3,59 A	3,37 A
164	7,25 A	4,66 BC	7,06 AB	3,87 C
178	6,75 A	6,84 A	6,24 A	7,13 A
192	7,49 A	7,51 A	8,48 A	6,98 A
206	6,06 B	7,50 AB	8,25 A	8,68 A
Área foliar (mm)				
150	1,21 A	1,7 A	1,38 A	0,9 A
164	5,3 A	2,94 B	3,39 B	1,06 B
178	3,7 A	5,33 A	3,9 A	4,77 A
192	5,23 A	3,52 A	5,35 A	4,62 A
206	3,58 A	6,29 A	3,97 A	3,37 A

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, nos diferentes níveis de nitrogênio ao nível de 5% de probabilidade.

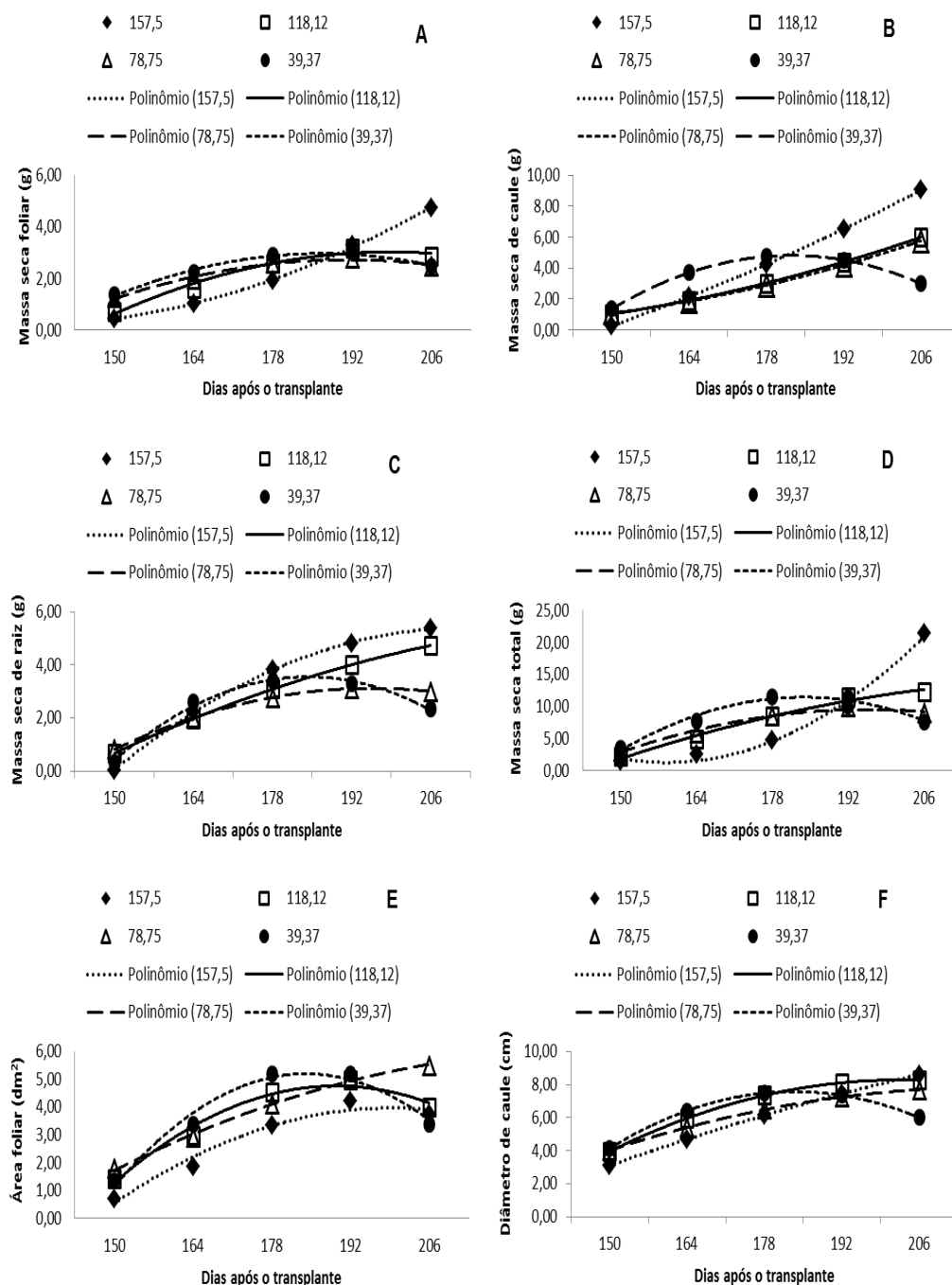


Figura 9: A – Massa seca total (MST); B – Massa seca de raiz (MSR); C – Massa seca de caule (MSC); D – Massa seca de folha (MSF), E – Área foliar (AF) e F – Diâmetro da haste de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio. Os resultados correspondem a médias de quatro repetições nas cinco colheitas. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática.



Figura 10: Plantas de *Annona emarginata* cultivadas com 157,5 e 118,12 mg L⁻¹ de N, ao 206 DAT. As setas indicam as brotações. Botucatu – SP, 2013, CAMPOS, F. G. (2013).

Razão de área foliar, área foliar específica, peso específico de folha, taxa assimilatória líquida e taxa de crescimento relativo

O peso específico de folha variou pouco nos diferentes tratamentos, destacando-se seu aumento aos 192 DAT nas plantas cultivadas com 157,5 mg L⁻¹ de N (Figura 11E).

A taxa assimilatória líquida e taxa de crescimento relativo decresceram ao longo do tempo nas plantas submetidas a 39,37; 78,75 e 118,12 mg L⁻¹ de N e aumentou naquelas nutridas com 157,5 mg L⁻¹ de N (Figuras 11B e D).

A área foliar específica variou pouco entre os tratamentos, destacando-se seu aumento aos 192 DAT nas plantas cultivadas com 78,75 mg L⁻¹ de N (Figura 11C).

A razão de área foliar das plantas submetidas a 118,12 mg L⁻¹ de N apresentou leve decréscimo ao longo do tempo, manteve-se constante nas plantas cultivadas com 39,37 mg L⁻¹ de N e revelou maior variação nas plantas submetidas aos demais tratamentos (Figura 11A).

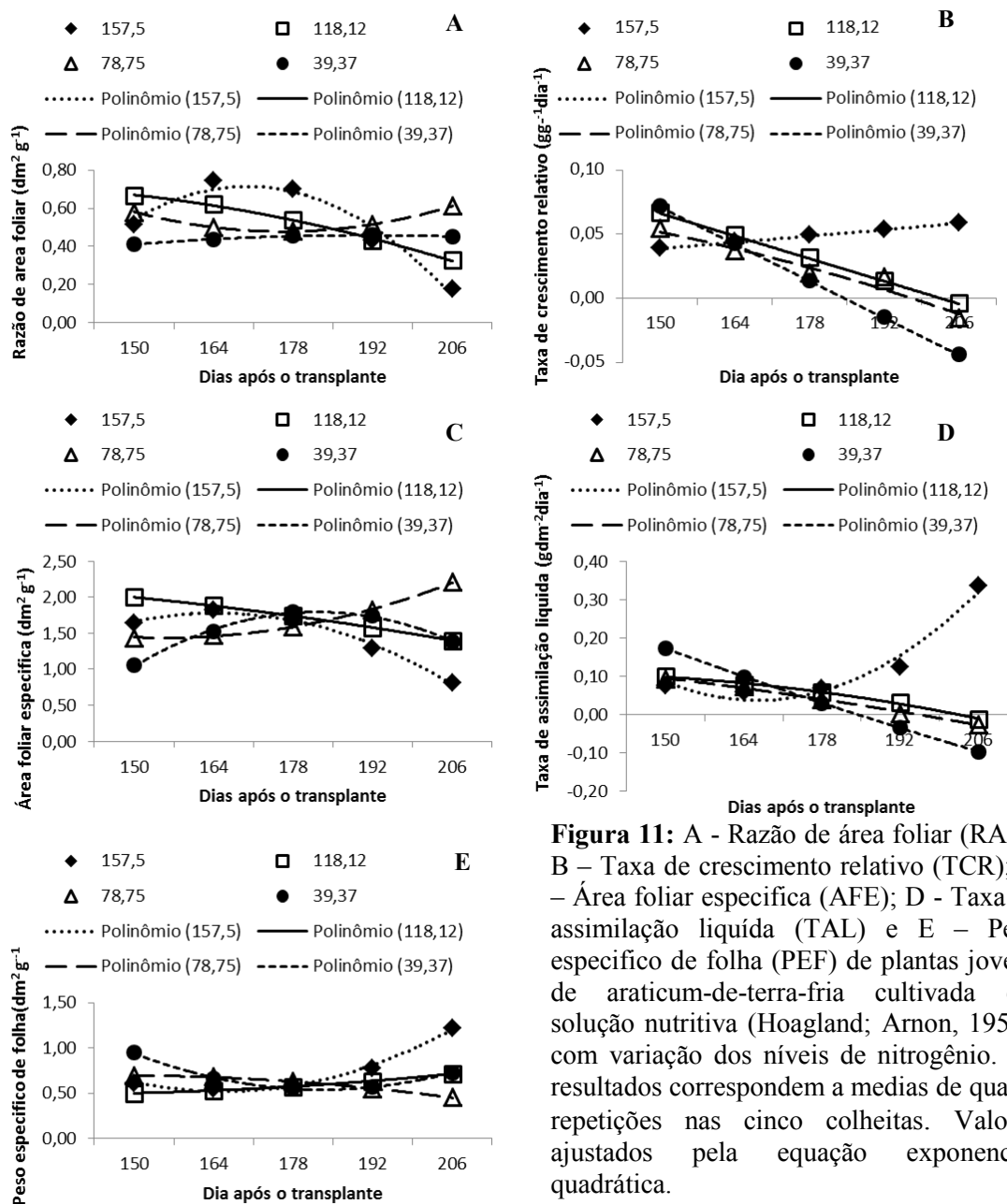


Figura 11: A - Razão de área foliar (RAF); B – Taxa de crescimento relativo (TCR); C – Área foliar específica (AFE); D - Taxa de assimilação líquida (TAL) e E – Peso específico de folha (PEF) de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio. Os resultados correspondem a médias de quatro repetições nas cinco colheitas. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática.

Distribuição de massa seca

As plantas submetidas a $157,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N apresentaram acúmulo de massa seca nos diferentes órgãos e razão de massa foliar (RMF) crescentes, até 178 DAT (Figura 12D), diminuindo a seguir. O maior acúmulo de massa seca foi verificado em caule e raiz (Figuras 12 B e D). Nos níveis iguais a $78,75$ e $118,12 \text{ mg L}^{-1}$ de N as plantas revelaram menor acúmulo de massa seca em folha e acréscimo no caule aos 178 DAT (Figuras 12A e B). As plantas submetidas a $39,37 \text{ mg L}^{-1}$ de N apresentaram diminuição de massa seca na folha, que se direcionou para a raiz até 178 DAT (Figuras 12A e C). A razão de massa foliar revela declínio da curva até 178 DAT, concordando com a distribuição de massa seca para raiz nesse período (Figura 12D).

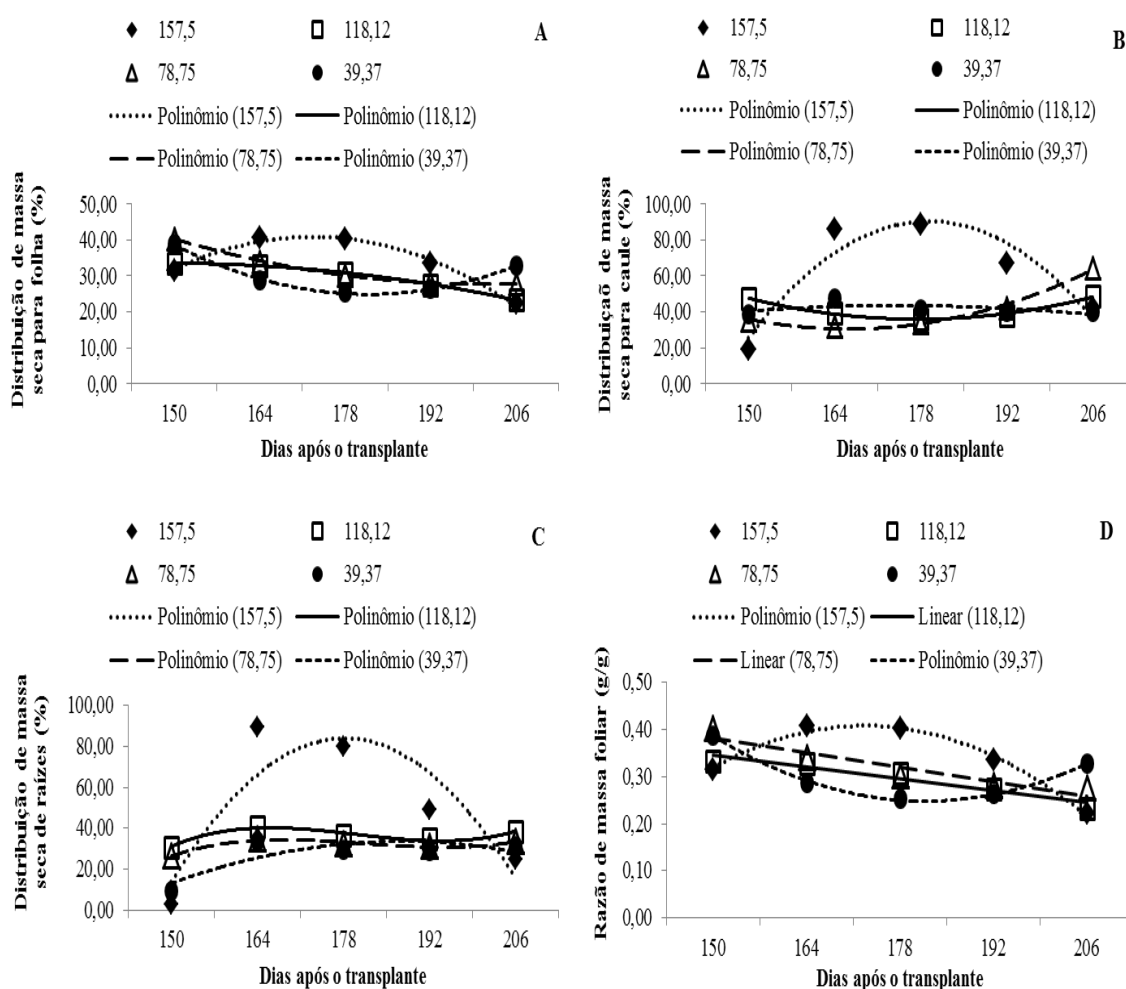


Figura 12: Distribuição de massa seca para folhas (A); Distribuição de massa seca para caule (B); Distribuição de massa seca para raiz (C) e Razão de massa foliar (D) de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio. Os resultados correspondem a medias de quatro repetições nas cinco colheitas. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática.

Composição dos voláteis foliares

Foram identificadas 48 substâncias voláteis nas folhas das plantas de *Annona emarginata* submetidas aos diferentes níveis de nitrogênio. Esses voláteis foram agrupados nas categorias. As plantas submetidas aos diferentes tratamentos apresentaram, em média, 73,44 % de seus voláteis como sesquiterpenos e 12,68 % como monoterpenos (Tabela 6).

Foram identificadas 15 substâncias voláteis com porcentagens superiores a 1% entre os voláteis extraídos das folhas de plantas submetidas aos diferentes níveis de nitrogênio. Entre elas, cinco substâncias majoritárias, equivalentes a 3% ou mais da composição dos voláteis, a saber, *trans*-cariofileno, biciclogermacreno, γ -gurjuneno, α -tujeno e β -elemeno foram verificadas nas plantas cultivadas em todos os tratamentos, exceto nas submetidas a 78,75 mg L⁻¹ de N, em que α -humuleno também foi identificado, em porcentagem $\geq 3\%$ e totalizando seis majoritários nessas plantas.

Entre as 39 substâncias voláteis foliares observadas no perfil químico das plantas cultivadas com 157,5 mg L⁻¹ de N (Tabela 4), foram identificadas cinco como majoritárias, *trans*-cariofileno (22,63%), biciclogermacreno (17,94%), γ -gurjuneno (12,10%), α -tujeno (6,69%) e β -elemeno (4,42%) (Tabela 7).

Quarenta e uma substâncias voláteis foram identificadas no perfil químico foliar das plantas submetidas a 118,12 mg L⁻¹ de N e *trans*-cariofileno (21,17%), biciclogermacreno (17,23%), γ -gurjuneno (10,26%), α -tujeno (6,33%) e β -elemeno (3,89%) se revelaram majoritárias (Tabela 6).

Nas plantas cultivadas com 78,75 mg L⁻¹ de N, entre as 46 substâncias voláteis identificadas no perfil químico foliar, *trans*-cariofileno (26,41%), biciclogermacreno (15,40%), γ -gurjuneno (9,77%), α -tujeno (5,68%), β -elemeno (3,09%) e α -humuleno (3,11%) foram majoritárias (Tabela 6).

Foram identificadas 46 substâncias voláteis no perfil químico foliar das plantas submetidas a 39,37 mg L⁻¹ de N, sendo majoritárias, *trans*-cariofileno (24,35%), biciclogermacreno (17,04%), γ -gurjuneno (11,35%), α -tujeno (6,62%) e β -elemeno (3,43%) (Tabela 6).

Tabela 6: Composição química dos compostos voláteis foliares de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio.

Substâncias	mg L ⁻¹ de N					
	IRC	IRL	39,37	78,75	118,12	157,5
Monoterpenos						
heptanal	903	902	0,27	0,18	0,00	0,05
α -tujeno	930	930	6,62	5,68	6,33	6,69
α -pineno	939	939	1,98	2,10	2,46	2,28
canfeno	950	954	0,00	0,00	0,00	0,00
sabineno	974	975	1,39	1,23	1,52	0,18
β -pineno	977	979	0,18	0,24	0,17	0,83
6-metil-5-hepten-2-ona	987	985	0,29	0,28	0,15	0,00
mirreno	991	990	0,80	0,57	0,61	0,28
acetato de hexila	1005	1009	0,37	0,34	0,26	0,09
δ -3-careno	1006	1011	0,25	0,20	0,15	0,04
<i>o</i> -cimeno	1023	1026	0,44	0,36	0,13	0,02
limoneno	1029	1029	0,53	0,42	0,28	0,00
1,8-cineol	1031	1031	0,00	0,28	0,00	0,00
<i>trans</i> - β -ocimeno	1048	1050	0,04	0,04	0,00	0,00
γ -terpineno	1058	1059	0,30	0,22	0,14	0,00
<i>n</i> -nonanal	1104	1100	0,64	0,60	0,50	0,05
terpinen-4-ol	1175	1177	0,09	0,09	0,03	0,00
<i>n</i> -decanal	1204	1201	0,36	0,13	0,00	0,00
Sesquiterpenos						
δ -elemeno	1336	1338	0,26	0,71	0,373	0,88
α -cubebeno	1349	1348	0,21	0,24	0,31	0,30
ciclosativeno	1366	1371	0,10	0,10	0,05	0,00
longiciclono	1368	1374	0,04	0,02	0,00	0,00
α -copaeno	1375	1376	1,22	2,41	2,00	1,84
β -bouboneno	1383	1388	1,22	1,06	1,62	1,45
β -cubebeno	1389	1388	0,91	0,74	1,12	1,26
β -elemeno	1391	1390	3,43	3,09	3,89	4,42
cipereno	1398	1398	0,43	0,54	0,62	0,47
<i>cis</i> -cariofileno	1408	1408	0,76	1,27	1,28	0,52
α -gurjuneno	1410	1409	0,03	0,00	0,00	0,00
<i>trans</i> -cariofileno	1418	1419	24,35	26,41	21,17	22,63
β -copaeno	1427	1432	0,52	0,58	0,68	0,56
β -gurjuneno	1434	1433	0,24	0,14	0,24	0,25
aromadendreno	1437	1439	0,93	0,52	0,64	0,77

α -humuleno	1452	1454	2,44	3,11	2,89	2,37
<i>allo</i> -aromadendreno	1459	1460	0,84	0,81	1,13	1,27
<i>cis</i> -cadina-1 (6), 4 dieno	1461	1463	0,48	0,62	0,53	0,66
<i>cis</i> -muurola-4 (14), 5 dieno	1465	1466	0,07	0,08	0,11	0,00
γ -gurjuneno	1480	1481	11,35	9,77	10,26	12,10
<i>trans</i> -muurola-4-(14), 5 dieno	1492	1493	0,15	0,00	0,25	0,24
biciclogermacreno	1495	1500	17,04	15,40	17,23	17,94
<i>trans</i> - β -guaieno	1499	1502	0,88	0,73	0,75	0,79
germacreno A	1504	1509	2,21	1,14	1,17	1,77
γ -cadineno	1512	1513	0,85	0,87	0,79	0,71
δ -cadineno	1522	1529	1,17	1,90	1,46	1,32
α -cadineno	1536	1538	0,00	0,03	0,04	0,00
germagreno B	1555	1561	0,15	0,57	0,45	0,34
espatulenol	1575	1578	0,18	0,21	0,25	0,11
óxide de cariofileno	1580	1583	0,24	0,37	0,58	0,34
epi- α -cadinol	1638	1640	0,22	0,14	0,00	0,07
Monoterpeno total			14,54	12,95	12,72	10,52
Sesquiterpeno total			72,91	73,61	71,86	75,37
Total identificado			87,45	86,56	84,58	85,89

ICR = índice de retenção calculado; IRL = índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007).

As concentrações, ou mesmo a época de detecção das substâncias voláteis identificadas nos diferentes perfis químicos variaram entre as plantas submetidas aos diferentes tratamentos, ao longo de seu desenvolvimento. Dessa forma, cada componente volátil apresentou-se em maior concentração em uma determinada época de colheita, na dependência do nível de nitrogênio a que as plantas foram submetidas.

Quando são consideradas as diferenças entre as porcentagens de voláteis nas plantas ao longo de seu desenvolvimento, o *trans*-cariofileno foi identificado em maior concentração nas plantas cultivadas com 78,75 e 39,37 mg L⁻¹ de N em relação às submetidas a 118,12 mg L⁻¹ de N, aos 150 DAT (Tabela 6).

Maior concentração de biciclogermacreno foi verificada nas plantas cultivadas com o menor nível de nitrogênio, 39,37 mg L⁻¹ de N aos 164 DAT (Tabela 7).

γ -gurjuneno, aumentou até 178 DAT nas plantas submetidas à 157,5 e 118,12 mg L⁻¹ de N, não diferindo entre elas. Nos menores níveis, 39,37 e 78,75 mg L⁻¹ de N, os maiores acúmulos foram detectados aos 164 e 206 DAT (Tabela 7).

O volátil α -tujeno apresentou-se em maior concentração nas plantas tratadas com 39,37 e 157,5 mg L⁻¹ de N aos 150 DAT (Tabela 7).

Tabela 7: Compostos voláteis majoritários da composição química foliar de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio.

mg L ⁻¹ de N	Dias após o transplante				
	150	164	178	192	206
<i>trans</i> -cariofileno					
39,37	38,93aA	24,58abB	21,45abBC	24,74aB	12,05cC
78,75	44,93aA	30,48aB	29,83aB	9,58bC	17,23bC
118,12	26,7bA	28,69aA	15,17bB	24,78aA	10,53cB
157,5	34,25abA	19,84bB	21,36abB	12,22bC	25,47aB
biciclogermacreno					
39,37	9,235bC	27,695aA	17,93aB	15,22bBC	15,145bBC
78,75	6,815bD	16,845bAB	10,69bC	20,38abA	15,76bB
118,12	4,335bC	15,335bB	19,48aAB	24,86aA	22,135aA
157,5	15,075aA	16,065bA	19,60aA	22,12abA	16,825bA
γ -gurjuneno					
39,37	1,27bD	17,54aA	12,19bB	6,03cC	19,73aA
78,75	8,3aAB	11,91bAB	6,44bB	6,12cB	16,09bA
118,12	1,04bC	1,46cC	21,07aA	13,82bB	13,92bcB
157,5	2,28abC	2,9cC	22,55aA	21,53aA	11,27cB
α -tujeno					
39,37	11,88abA	4,44aBC	5,535bBC	3,065dC	8,175aAB
78,75	7,57bA	6,24aA	6,565bA	6,17bA	1,83bB
118,12	7,745bA	5,15aAB	1,96cB	9,175aA	7,615aA
157,5	12,78aA	3,795aC	10,205aB	4,285cC	2,4bD
β -elemeno					
39,37	0,98cB	3,89abAB	0,675aB	4,84aA	6,78aA
78,75	3,41bB	2,035bBC	1,045aC	1,72bBC	7,26aA
118,12	7,85aA	0,85bC	0,84aC	4,57aB	5,34aB
157,5	7,625aA	7,555aA	1,37aC	1,09bC	4,48aB
α -humuleno					
39,37	3,28bA	2,57aAB	2,15aB	2,51aAB	1,69bB
78,75	4,24aA	3,57aA	2,94aAB	1,77aB	3,05aAB
118,12	3,75abA	3,65aA	3,07aAB	2,45aAB	1,54bB
157,5	3,33bA	2,12aB	2,19aB	1,84aB	2,36abB

Letras maiúsculas nas linhas compara diferenças entre épocas de colheita em cada nível de nitrogênio e minúsculas, nas colunas entre níveis de nitrogênio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

As plantas submetidas às maiores concentrações de nitrogênio, apresentaram maior acúmulo de β -elemeno, aos 150 e 164 DAT quando nutridas com 157,5 mg L⁻¹ de N e aos 150 DAT quando nutridas com 118,12 mg L⁻¹ de N. Já as submetidas às menores concentrações, 78,75 e 39,37 mg L⁻¹ de N, apresentaram maiores acúmulos aos 192 e 206 DAT (Tabela 7).

O α -humuleno apresentou maior acúmulo nas plantas submetidas a 78,75 mg L⁻¹ de N, aos 150 DAT, em relação às nutridas com 157,5 e 39,37 mg L⁻¹ de N (Tabela 7).

Tabela 8: Compostos voláteis minoritários (entre 1 e 3%) da composição química foliar de plantas jovens de araticum-de-terra-fria cultivada em solução nutritiva de (Hoagland; Arnon, 1950), com variação dos níveis de nitrogênio.

mg L ⁻¹ de N	Dias após o transplante				
	150	164	178	192	206
<i>α-pineno</i>					
39,37	3,94aA	1,17bB	1,06aB	1,295cB	2,435aAB
78,75	2,15aA	2,1abA	1,82aA	2,665aA	1,78abA
118,12	2,96aA	2,68aA	1,86aA	2,395abA	2,415aA
157,5	3,63aA	1,46abA	3,73aA	1,6bcA	0,985bA
<i>δ-cadineno</i>					
39,37	1,625aA	1,08aB	0,93bB	1,2bAB	1,01bcB
78,75	1,5aBC	1,13aC	1,04bC	2,265aB	3,56aA
118,12	1,465aB	1,39aB	1,98aA	0,96bC	1,50bB
157,5	1,31aB	1,46aB	0,77bB	2,37aA	0,7cB
<i>cis</i> -cariofileno					
39,37	3,57bcA	0,23bB	0aB	0cB	0aB
78,75	5,78aA	0,28bB	0,13aB	0,19bB	0aB
118,12	5,47abA	0,56aB	0aC	0,35aB	0aC
157,5	1,95cA	0,63aB	0aC	0cC	0aC
<i>germacreno A</i>					
39,37	2,13aA	3,8aA	0,08aB	2,52aA	2,51aA
78,75	0,8aB	1,48bcAB	0,72aB	0,65bB	2,06aA
118,12	1,95aA	0,55cB	0,37aB	1,14bAB	1,82aA
157,5	1,9aAB	2,405abA	0,67aC	1,17bBC	2,71aA

Letras maiúsculas nas linhas compara diferenças entre épocas de colheita em cada nível de nitrogênio e minúsculas, nas colunas entre níveis de nitrogênio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Quando são consideradas as substâncias identificadas com porcentagens entre 1 e 3%, α -pineno revelou maior acúmulo aos 150 DAT nas plantas

submetidas a todos os tratamentos. Germacreno A e δ -cadineno apresentaram maiores acúmulos nas plantas cultivadas com 39,37 mg L⁻¹ de N, respectivamente, aos 164 e 206 DAT, revelando-se nessas colheitas majoritários entre os voláteis. *Cis*-cariofileno apresentou maior acúmulo nas plantas cultivadas com 118,12 e 78,75 mg L⁻¹ de N aos 150 DAT, majoritário nessa época (Tabela 8).

Discussão

A comparação dos resultados do presente estudo com outros envolvendo espécies não arbustivas ou que não pertencem a família Annonaceae se deve ao fato desses trabalhos não terem sido identificados na literatura consultada.

As plantas submetidas a $157,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N apresentaram menor taxa de assimilação de CO_2 e eficiência de carboxilação, ao longo do desenvolvimento (Figura 2A e E). A atividade da nitrato redutase, maior nessas plantas é responsável pela assimilação de nitrogênio (Figura 4 e Tabela 4), o que talvez explique esses resultados, levando-se em consideração a competição entre a assimilação de carbono e a incorporação do nitrogênio por $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (STITT et al., 2010). A queda na atividade dessa enzima aos 192 DAT coincidiu com a injeção de CO_2 para a determinação da curva A_{net}/C_i , demonstrando uma vez mais a competição entre os dois processos acima referidos e que estão de acordo com o observado em plantas de morango (*Fragaria x ananassa* var Camarosa) expostas ao sol, que revelaram elevadas concentrações de nitrato e baixas taxas de assimilação de CO_2 . Nessas plantas foi identificada correlação positiva entre a atividade da nitrato redutase e o aumento da concentração de nitrato (TABATABAEI et al., 2008).

Nessas mesmas plantas de anonas submetidas a $157,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N a condutância estomática foi baixa (Figura 2B). Suprimentos elevados de nitrato para as plantas podem ocasionar aumento da atividade da nitrato redutase, aumentando a concentração de nitrito na célula para níveis tóxicos, o que normalmente não ocorre, uma vez que, a atividade da nitrito redutase, que converte nitrito em amônio, é muito maior do que a da nitrato redutase. O acúmulo de nitrito induz a nitrato redutase a

catalisar a sua redução a óxido nítrico, utilizando NADPH+H como doador de elétrons (NEILL et al., 2008; ROSALES et al., 2011; MENDEL; KRUSE, 2012). O óxido nítrico tem influência em diversos processos fisiológicos das plantas como, por exemplo, a oclusão estomática, o que pode explicar a baixa condutância estomática observada nas plantas cultivadas com o maior nível de N.

Nessas plantas cultivadas com 157,5 mg L⁻¹ de N a velocidade máxima de carboxilação (V_{cmax}) (Figura 3A) foi tão elevada quanto naquelas cultivadas com 78,75 e 118,12 mg L⁻¹ de N. Entretanto, não houve diferenças entre os tratamentos para a condutância do mesófilo (g_m) (Figura 3C). Assim, a maior taxa de assimilação líquida observada nas plantas tratadas com 78,75 e 118,12 mg L⁻¹ de N foi ocasionada pela maior atividade da Rubisco. Porém, no tratamento com 157,5 mg L⁻¹ de N houve uma diminuição na taxa de assimilação líquida de CO₂ (Figura 2A), provavelmente devido a menor condutância estomática, como foi explicado anteriormente.

Diversos trabalhos têm identificado uma relação positiva entre a concentração foliar de nitrogênio e a taxa fotossintética líquida, visto que esse elemento é parte integrante dos principais componentes do sistema fotossintético, tais como, clorofila e ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase (Rubisco). Além disso, com deficiência de nitrogênio, a atividade carboxilativa da Rubisco é seriamente reduzida (CRUZ, 2001).

A maior atividade da nitrato redutase nas plantas cultivadas com 78,75 e 118,12 mg L⁻¹ de N (Figura 4 e Tabela 3), talvez esteja relacionada com a sua maior massa seca de folha, aumento da RAF, AFE, TAL, TCR (Figura 10A, B, C, D), e acúmulo de massa seca na folha ao se avaliar a distribuição da matéria orgânica (Figura 12). Vários estudos demonstram que o aumento na disponibilidade de nitrogênio estimula o desenvolvimento vegetativo, tendo um maior investimento na produção de folhas (MAY et al., 2010; RUBIO-WILHELMI et al., 2011). Como consequência, as plantas cultivadas com 118,12 e 157,5 mg L⁻¹ de N também apresentaram maior formação de raízes e de caules (Figura 9C e B), conforme já observado por Krouk et al. (2010), ao avaliar o sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. Deve-se ressaltar que caules e raízes são órgãos que devem ser considerados em espécies utilizados como porta-enxerto, que é o caso da *A. emarginata* (TAKAHASHI, 2008).

É possível que o nitrogênio fornecido às plantas cultivadas com seu nível igual a 118,12 e 157,5 mg L⁻¹ de N tenha interferido com a síntese e a sinalização de hormônios, como a auxina e a citocinina. Essa afirmativa encontra apoio no conhecimento de que a auxina é responsável pelo desenvolvimento de raízes laterais e sua distribuição no vegetal é facilitada pelo transportador de nitrato (NRT1.1). No entanto, essa auxina dependente do transportador é inibida em condições de elevada disponibilidade de nitrato, levando a seu acúmulo na região de formação das raízes laterais (KROUK et al., 2010; BEECKMAN; FRIML, 2010), o que pode explicar maior desenvolvimento e acúmulo de matéria seca nas raízes (Figura 9B).

O íon nitrato está relacionado com a formação de citocinina, hormônio responsável por alterações morfológicas no vegetal, modulando a expressão dos genes *AtIPT3* e *AtIPT5*, responsáveis pela síntese desse hormônio (TAKEI et al., 2004; GUTIÉRREZ, et al., 2013). Nas plantas cultivadas com os maiores níveis de nitrogênio, 118,12 e 157,5 mg L⁻¹ de N, a ação do nitrato talvez explique por ação na síntese de citocinina, maior desenvolvimento de ramos laterais e acúmulo de matéria orgânica em caules (Figura 9C).

As plantas cultivadas com 78,75 e 118,12 mg L⁻¹ de N apresentaram elevadas taxas de assimilação de CO₂ e eficiência de carboxilação, com elevação da atividade da nitrato redutase ao longo do tempo. Esses resultados concordam com os de Tabatabaei et al (2008), que verificaram elevada taxa de assimilação de carbono e atividade da nitrato redutase em plantas de morango (*Fragaria x ananassa* var Camarosa) cultivadas com relação 50 NH₄ : 50 NO₃. A manutenção da elevada atividade da nitrato redutase nas plantas de *A. emarginata* cultivadas com 118,12 mg L⁻¹ de N em condições de maiores disponibilidades de injeção de CO₂ para a execução da curva de carboxilação, talvez se justifique pela maior taxa respiratória (*Rd**) observada nessas plantas (Figura 3E), com maior síntese de NADH+H⁺, ou seja, doador de elétrons para a redução do nitrato, conforme afirmam os estudos de Shen et al., (1976), Ahmad e Abdin, (1999), Geiger et al., (1999) e Lemos et al., (2008).

Essas plantas cultivadas com 78,75 e 39,37 mg L⁻¹ de N não mantiveram a atividade da nitrato redutase aos 192 DAT, quando os níveis de CO₂ foram elevados. Como nessas plantas não foram identificadas diferenças na taxa de transporte de elétrons (J) (Figura 3E), a quantidade de NADPH+H⁺ foi a mesma, uma vez que, essa variável é estimada pela quantidade de elétrons requeridos para redução

do NADP^+ (SHARKEY et al., 2007). Dessa forma, houve direcionamento da coenzima reduzida, $\text{NADPH}+\text{H}$, para a assimilação de CO_2 . As baixas taxas respiratórias nessas plantas concordam com a afirmativa acima e com a baixa atividade da nitrato redutase (Figura 3 E). Portanto, o nível de nitrogênio igual a $78,75 \text{ mg L}^{-1}$ de N foi suficiente para a manutenção da taxa de assimilação de CO_2 nas plantas quando comparado ao de $39,37 \text{ mg L}^{-1}$ de N.

Nas plantas cultivadas com $78,75$ e $118,12 \text{ mg L}^{-1}$ de N as elevadas taxas de assimilação de CO_2 , carboxilação e atividade da nitrato redutase resultaram em maior acúmulo de matéria seca no caule e raiz. Além disso, o decréscimo da RMF indica a translocação da matéria orgânica do centro de produção, ou seja, da folha para as outras partes do vegetal, ou seja, caules e raízes, que apresentaram maior desenvolvimento de ramos e raízes laterais. Essas plantas apresentaram crescimento mais rápido, demonstrado pelo declínio da TCR e melhor eficiência fotossintética, revelada pelo declínio da TAL, quando comparadas com as plantas nutridas com $157,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N (Figura 11B e D).

As plantas cultivadas com $39,37 \text{ mg L}^{-1}$ de N apresentaram menor taxa de assimilação de carbono, condutância estomática, transpiração, eficiência de carboxilação, velocidade máxima de carboxilação, respiração e menor atividade da nitrato redutase (Figura 2A, B, C e E; Figura 3A e E; Figura 4 e Tabela 2). Essas plantas apresentaram eficiência fotossintética e adequado crescimento em função de material pré-existente, em relação às demais, representados pelas inclinações das curvas de TAL e TCR, embora esse menor nível de nitrogênio tenha resultado em menores massas secas de folhas, caules e raízes. O investimento dessas plantas em área foliar explica sua melhor eficiência fotossintética e crescimento com base em material pré-existente (TCR), além do menor acúmulo de matéria seca em caules e raízes (Figura 9 e 11).

Nesse contexto também deve ser considerada a atividade das enzimas antioxidantes em *A. emarginata* submetidas aos diferentes níveis de nitrogênio. De maneira geral, as atividades dessas enzimas não diferiram entre as plantas submetidas aos diferentes níveis de nitrogênio, exceto aos 192 DAT, quando as plantas submetidas a todos os tratamentos apresentaram maior atividade da superóxido dismutase, catalase e peroxidase (Figura 5, 6 e 7 e Tabela 4), provavelmente devido à injeção de CO_2 e fornecimento de luz saturante para a realização das curvas de

carboxilação. Essas condições devem ter resultado em aumento de espécies reativas de oxigênio, concordando com o descrito por Foyer e Shigeoka (2011).

Aos 192 DAT as plantas cultivadas com a maior concentração de nitrogênio, 157,5 mg L⁻¹ apresentaram maior atividade da SOD (Figura 5 e Tabela 3), que de acordo com Apel e Hirt, (2004) é a primeira enzima envolvida na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs) e seu aumento é uma condição que pode indicar estresse (SCHMITT et al., 2014). A elevada atividade da SOD é confirmada pela maior atividade da CAT (Figura 5 e 7 e Tabela 4), que neutraliza o peróxido de hidrogênio resultante da ação da SOD (RAI et al., 2004; HONG-WEI et al., 2010).

Segundo Misra e Gupta (2006), a POD, enzima que atua após a SOD, apresenta maior atividade quando o nitrogênio é fornecido na forma de nitrato, o que não deve ter ocorrido no presente estudo com *A. emarginata*, uma vez que a atividade da POD variou pouco. Apenas as plantas cultivadas com 39,37 mg L⁻¹ de N apresentaram expressiva atividade da POD aos 192 DAT, que pode ter sido resultado da injeção de CO₂, fornecimento de nitrato ou outro fator (Figura 5 e Tabela 4).

As alterações observadas na atividade das enzimas antioxidantes aos 192 DAT foram suficientes para evitar a peroxidação de lipídios, tendo sido eficientes para neutralizar o estresse causado pela elevação do CO₂. A concentração de Malonaldeído (MDA) que expressa a peroxidação de lipídios é considerada marcador para estresse nas plantas e seu aumento representa destruição da membrana (ANJUM et al., 2011), o que não foi verificado no presente estudo (Figura 8 e Tabela 4).

Plantas cultivadas com variação de nitrogênio apresentam alteração do perfil químico dos voláteis foliares (Tabela 6) e 48 substâncias foram identificadas nas plantas de *A. emarginata* cuja presença e porcentagem variaram segundo o nível de nitrogênio. Esses resultados concordam com os verificados por Veromann et al. (2013) em que variação de nitrogênio no cultivo de *Brassica napus* resultou em diferentes porcentagens de monoterpenos e sesquiterpenos no estágio de florescimento.

O aumento da concentração de terpenos (Tabela 6), com a diminuição do nível de nitrogênio no cultivo das plantas de araticum-de-terra-fria pode ter sido resultado de estresse nas plantas, uma vez que, isoprenos, monoterpenos e sesquiterpenos, envolvidos na resistência a estresse abióticos, reagem rapidamente com

EROs. A comparação desses resultados envolve dificuldades na precisão da quantificação das taxas de emissão de sesquiterpenos em função da sua elevada reatividade e sensibilidade a estresses (BAKKALI et al., 2008; VICKERS et al., 2009).

Como em média, 73,44% da composição dos voláteis foliares são sesquiterpenos (Tabela 6), tem-se um indicativo de que a principal rota de formação dos terpenos na *A. emarginata* é a do ácido mevalônico (MVA), que ocorre no citosol, retículo endoplasmático, peroxissomos e mitocôndria (NAGEGOWDA, 2010).

As plantas cultivadas com 39,37 mg L⁻¹ de N revelaram maior número de substâncias voláteis foliares. Nessas plantas a menor disponibilidade de nitrogênio deve ter levado a aumento de espécies reativas de oxigênio, conforme demonstram as avaliações das enzimas antioxidantes, CAT e POD (Figuras 7 e Tabela 5), com maiores atividades, indicativas de estresse nessas plantas submetidas a menor nível de nitrogênio, nas quais a menor assimilação de CO₂ (Figura 2 A), menor atividade de nitrato redutase (Figura 4 e Tabela 3) e maior síntese de terpenos (Tabela 6) indica desequilíbrio entre os três processos metabólicos, dependentes da coenzima NADPH+H⁺ (BACH et al., 1995; LEMOS et al., 2008; ZHAO et al., 2013 SELMAR; KLEINWÄCHTER, 2013; DANI et al., 2014) e avaliada pela taxa de transporte de elétrons (*J*) (Figura 3B), em favor da síntese de terpenos, pelas rotas do ácido mevalônico e do fosfato metileritritol.

O cultivo de *A. emarginata* com variação de nitrogênio alterou o perfil químico dos terpenos, o número de substâncias e suas porcentagens nas plantas (Tabela 6), cujos resultados são parcialmente concordantes com aqueles observados no estudo de *Annona salzmannii* e de *Annona pickelii* realizado por Costa et al. (2013), em que os autores referem na primeira espécie, entre os terpenos, quatro substâncias majoritárias, das quais apenas uma não foi identificada no presente estudo. Na espécie *Annona pickelii* os autores referem cinco substâncias majoritárias, entre as quais, apenas duas foram identificadas em *A. emarginata* cultivada com variação de nitrogênio. Os resultados obtidos em *A. emarginata* também são parcialmente concordantes com aqueles observados no estudo de *Annona emarginata* realizado por Campos et al. (2014). No presente estudo foram identificadas 48 substâncias, entre as quais cinco majoritárias nas plantas submetidas aos diferentes níveis de nitrogênio. No estudo de Campos et al. (2014), em que as plantas foram cultivadas em substrato fertilizado com solução nutritiva completa sem variação de nitrogênio, 11 substâncias foram

identificadas e entre as cinco majoritárias, apenas duas comuns ao presente estudo com porcentagens totalmente diferentes. Esses resultados indicam que a variação do nível de nitrogênio no cultivo da mesma espécie modificou o perfil químico dos terpenos, o número de substâncias que definiram esse perfil e suas porcentagens.

Considerando-se as substâncias identificadas nas plantas cultivadas com variação de nitrogênio, entre as seis majoritárias, com porcentagens acima de 3%, *trans*-cariofileno, biciclogermacreno, γ -gurjuneno, α -tujeno, β -elemeno, α -humuleno (Tabela 8) e outras quatro, verificadas com porcentagens entre 1% e 3%, α -pineno, germacreno A, δ -cadineno e *cis*-cariofileno (Tabela 9), algumas apresentam atividades biológicas já reconhecidas na literatura científica. *Trans*-cariofileno é utilizado como anti-inflamatório e no tratamento de endometriose (FERNANDES et al., 2007; ABBAS et al., 2013), sendo precursor do óxido de cariofileno, conhecido pela sua ação fungicida (ODA et al., 2011). β -elemeno apresenta ação anti-glioblastoma, câncer agressivo do cérebro, (YOA et al., 2008). α -pineno apresenta atividade bactericida (LEITE et al., 2007), α -humuleno apresenta atividade anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2007) e δ -cadineno é principal precursor das fitoalexinas, substâncias de defesa das plantas contra bactérias e fungos (CHEN et al., 1995).

O biciclogermacreno é precursor do espatulenol (KESZEI et al., 2010). Embora as duas substâncias tenham sido identificadas no presente estudo, não foi observado aumento do espatulenol e nem mesmo decréscimo do biciclogermacreno, que se manteve sempre elevado. Esses resultados concordam com os observados em outros estudos, envolvendo espécies da família Annonaceae, que sempre revelam a presença de biciclogermacreno, como majoritário (RÍOS et al., 2003; VALTER et al., 2008; COSTA et al., 2009; SIQUERA et al., 2010; COSTA et al., 2013). Deve ser registrado que, embora nenhuma atividade biológica tenha sido identificada na literatura consultada, sua presença no óleo das anonáceas em elevada porcentagem sugere atividade biológica para a espécie.

Considerando-se o perfil químico dos voláteis foliares nas plantas submetidas aos diferentes níveis de nitrogênio observa-se que a variação desse nutriente modifica o óleo essencial foliar de *A. emarginata*. Esses resultados concordam com os verificados por Leal (2001), em plantas de *Mentha piperita* cultivadas com variação dos níveis de nitrogênio.

Considerações finais

As plantas submetidas a $157,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N apresentaram aumento na TCR, TAL, RAF, AFE, PEF e RMF, demonstrando maior investimento na produção de folhas, confirmado pelas menores taxas de assimilação de CO_2 , condutância estomática e eficiência de carboxilação. No entanto, essas plantas apresentaram elevadas atividade da nitrato redutase, velocidade máxima de carboxilação e taxa respiratória, indicativos de competição entre a assimilação de carbono e de nitrogênio. Embora as atividades das enzimas antioxidantes, CAT e POD tenham sido elevadas, não foi observado maior número de terpenos, que ao contrário, foi o mais baixo, o que deve estar relacionado com a disponibilidade de coenzimas $\text{NADPH} + \text{H}^+$, requeridas para a síntese de terpenos, assimilação de CO_2 e nitrogênio.

As plantas submetidas a $78,75$ e $118,12 \text{ mg L}^{-1}$ de N apresentaram decréscimo na TCR e TAL, ou seja, adequado desenvolvimento, confirmado pelas elevadas taxas de assimilação de CO_2 , condutância estomática, velocidade máxima de carboxilação, eficiência de carboxilação e atividade da nitrato redutase, resultando em maior acúmulo de massa seca de caule e raiz e maior diâmetro de caule. As plantas submetidas a $78,75 \text{ mg L}^{-1}$ de N, da mesma forma que nas cultivadas com $39,37 \text{ mg L}^{-1}$ de N, as atividades das enzimas antioxidantes, SOD e POD, foram mais elevadas, sugerindo estresse, condição confirmada pelo maior número de substâncias voláteis, entre as quais, terpenos, resultantes das reações com as EROS, ao contrário das plantas nutridas com $118,12 \text{ mg L}^{-1}$ de N, em que a atividade das enzimas antioxidantes se manteve estável, não indicando estresse, o que foi confirmado pelo menor número de substâncias voláteis encontradas no perfil químico. Essa

condição, favorece o cultivo das plantas com o nível de nitrogênio igual a 118,12 mg L⁻¹.

As plantas cultivadas com 39,37 mg L⁻¹ de N apresentaram decréscimo na TCR e TAL, indicando desenvolvimento mais rápido. No entanto, as baixas taxas de assimilação de CO₂, condutância estomática, velocidade máxima de carboxilação (V_{cmax}), taxa de respiração, eficiências de carboxilação e atividade da nitrato redutase resultaram em menor acúmulo de matéria seca nos caules e raízes e menor diâmetro de caule. A maior atividade das enzimas antioxidantes, CAT e POD, sugerem estresse das plantas como resultado do menor nível de nitrogênio utilizado em seu cultivo, condição confirmada pelo maior número de terpenos identificados.

Com base no exposto e na dependência do que se espera das espécies em relação a sua produtividade ou produção de voláteis foliares, as plantas podem ser cultivadas com variação do nível de nitrogênio. Por outro lado, sugere-se o nível de 118,12 mg L⁻¹ de N se o objetivo é a produção de mudas para a enxertia, uma vez que, as plantas apresentaram adequados diâmetro de caule e produtividade, não demonstrando estresse oxidativo resultante do nível de nitrogênio utilizado.

Conclusões

A atividade da nitrato redutase variou com os diferentes níveis de nitrogênio a que as plantas foram submetidas. A competição entre a assimilação de CO₂, fixação de nitrogênio e síntese de terpenos, determinou que plantas com maior oferta de nitrogênio apresentassem menor produtividade.

A atividade das enzimas antioxidantes evitou a peroxidação lipídica nas plantas submetidas aos diferentes níveis de nitrogênio.

As trocas gasosas, atividade da nitrato redutase e das enzimas antioxidantes nas plantas cultivadas com níveis intermediários de nitrogênio garantiram melhor produtividade.

A variação de nitrogênio para o cultivo de *A. emarginata* modifica o perfil químico de seu óleo essencial foliar, demonstrando a sua plasticidade.

O aumento do número de substâncias voláteis foliares com a diminuição do nível de nitrogênio sugere estresse das plantas.

Revisão bibliográfica

ABBAS, A. M. β -Caryophyllene causes regression of endometrial implants in a rat model of endometriosis without affecting fertility. **European Journal of Pharmacology**, v. 702, p.12–19, 2013.

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.

AHMAD, A.; ABDIN, M.Z. NADH: nitrate reductase and NAD(P)H: nitrate reductase activities in mustard seedlings. **Plant Science**, v.143, p.1–8, 1999.

ALALI, F.Q. et al. Annonaceus Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, v.62, p.504-540, 1999.

ALFONSI, E.L. **Avaliação do potencial para porta-enxerto de genótipos de coffea, por meio de características fisiológicas de crescimento, trocas gasosas fotossintéticas e nutrição mineral**. 2003. 87f. Dissertação (Mestrado) - Agricultura tropical e subtropical, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, 2003.

ALVAREZ, R.C.F. et al. Análise de crescimento de duas cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, n.4, p.611-616, 2005.

AMTMANN, A.; BLATT, M.R. Regulation of macronutrient transport. **New Phytologist**, v.181, p.35–52, 2009.

ANJUM, S.A. et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v.6, n.9, p.2026-2032, 2011.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373–99, 2004.

ASLAM, M.; TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Physiology**, v.99, p.1124-1133, 1992.

BACH, T. J. Some New Aspects of Isoprenoid Biosynthesis in Plants A Review. **Lipids**, v. 30, n. 3, 1995.

BARON, D. et al.. Gas exchange, physiological indexes and ionic accumulation in *annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer seedlings in nutrients solution. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.2, p.361-376, 2013.

BARON, D. et al. Gas exchanges in annonaceae species under different crop protections. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, ed especial, p.243-250, 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446–475, 2008.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n.1, p.276-287, 1971.

BEECKMAN, T.; FRIML, J. Nitrate Contra Auxin: Nutrient Sensing by Roots. **Developmental Cell**, v.18, p.877-878, 2010.

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. Jaboticabal: Fundação Nacional de Ensino e Pesquisa, 2003. 41p.

BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v.22, p.269-303, 2005.

BERRY, J.; BJORKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.31, p.491-543, 1980.

BONAVENTURE, L. **A cultura de Cherimóia e seu híbrido, a Atemoia**. São Paulo: Nobel, 1999. 182p.

BOWSER, C. G., et al. The effect of Glc6P uptake and its subsequent oxidation within pea root plastids on nitrite reduction and glutamate synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.1109–1118, 2007.

BLOOM, A. J. et al. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. **Science**, v.328, p.899–903, 2010.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists. 2000. 1367 p.

CAI, Z.Q. et al. Seedling Growth Strategies in *Bauhinia* Species: Comparing Lianas and Trees. **Annals of Botany**, v.100, p.831–838, 2007.

CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure function and regulation bridging to gap between biochemistry and physiology. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, n.1, p.277-303, 1999.

CAMPOS, F. G. et al. Characterization of the chemical composition of the essential oils from *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘terra-fria’ and *Annona squamosa* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, edição especial, p.202-208, 2014.

CARMELLO, Q.A.C. Hidroponia. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20., 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” – CENA, 1992, p.355-368.

CASTELLANE, P.D.; ARAUJO, J.A.C. **Cultivo sem solo: hidroponia**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994. 43p.

CAUSTON, D.R.; VENUS, J.C. **The biometry of plant growth**. London: Edward Arnold, 1981. 307p.

CAVÉ, A. et al. Acetogenins from Annonaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. v.70, p.81-288, 1997.

CHATROU, L.W. et al. The natural history of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.169, p.1–4, 2012.

CHATROU, L.W. et al. Annonaceae (Soursop Family). In: SMITH, N. **Flowering Plants of the Geotropism**. New York: The New York Botanical Garden, 2004, p18-20.

CHATROU, L.W. Las Annonaceae y el proyecto Annonaceae: una breve revisión de su estado actual. **Acta Horticulturae**, v.497. n.1, p.51-57, 1999.

CHAVAN, M.J. et al. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. bark. **Natural Product Research**, v.20, n.8, p.754–757, 2006.

CHEN, X. Y. Cloning, Expression, and Characterization of (+)- δ -Cadinene Synthase: A Catalyst for Cotton Phytoalexin Biosynthesis. **Archives of biochemistry and biophysics**. v. 324, n. 2, p. 255–266, 1995.

COSTA, V.C.O. et al. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18 n.2, p.245-248, 2008.

COSTA, V. E. et al. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmännii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural Product Research**. v. 27, n. 11, 997–1001, 2013.

COSTA, V. E. et al. Antimicrobial and Antileishmanial Activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae) **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 78-81, 2009.

COUVREUR, T.L.P. et al. Keys to the genera of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.169, p.74–83, 2012.

CRUZ, J.L. et al. Crescimento e partição de matéria seca e de carbono no mamoeiro em resposta à nutrição nitrogenada. **Bragantia**, v.63, n.3, p.351-361, 2004.

CRUZ, J.L. **Efeitos de níveis de nitrato sobre o metabolismo do nitrogênio, assimilação do CO₂ e fluorescência da clorofila a em mandioca**. 2001. 87f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

DABRAH, T.T.; SNEDEN, A.T. Rollinacin and isorollinacin, cytotoxic acetogenins from *Rollinia papilionella*. **Phytochemistry**, v.23, n.9, p.2013-2016, 1984.

DANI, K. G. S. et al. Evolution of isoprene emission capacity in plants. **Trends in Plant Science**, v. x, n. x, p. x, 2014. (in press)

DE LA CRUZ-CHACÓN, I.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. **Natural Product Research**. v.26, n.1, p.42-49, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2.ed., New York: John Wiley & Sons Inc., 2002. 507p.

DIAS, M.C. **Estudos taxonômicos do gênero *Xylopia* L. (Annonacea) no Brasil extra-amazonico**. 1988. 183f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 1988.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v.21, n.4, p.308-23, 2007.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas, princípios e perspectivas**. 2.ed., Londrina: Editora Planta, 2006. 403p.

FAGUNDES; F.A; et al. *Annona coriacea* induz o efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p.24-29, 2005.

FAQUIM, V.; FURTINI NETO, A.E.; VILELA, L.A. **Produção de alface em hidroponia**. Lavras: UFLA, 1996. 50p.

FAQUIN, V.; FURLANI, P.R. Cultivo de hortaliças de folhas em hidroponia em ambiente protegido. **Informe Agropecuário**, v.20, n.200/201, p.99-104, 1999.

FARQUHAR, G.D., SHARKEY, T.D. Stomatal Conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v.33, p.317-345, 1982.

FERNANDES, R. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds *alpha*-humulene and (-) – *trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenaceae*. **European Journal of Pharmacology, Amsterdam**, v. 569, p. 228-236. 2007.

FOYER, C.H; SHIGEOKA, S. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. **Plant Physiology**, v.155, p.93–100, 2011.

FURLANI, P.R.; SILVERA, L.C.P.; BOLANHEZI, D.; FAQUIM, V. **Cultivo hidropônico de plantas**. Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 52p.

GARG, S.N .; GUPTA, D. Composition of the Leaf Oil of *Annona squamosa* L. from the North Indian Plains. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, n.3, p.257-258, 2005.

GEIGER, M. et al. The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. **Plant, Cell and Environment**, v.22, p.1177–1199, 1999.

GHOLAMHOSSEINPOUR, Z. et al. Effect of Nitrogen Fertilizer on Field and Amount of Alkaloids in Periwinkle and Determination of Vinblastine and Vincristine by HPLC and TLC. **Plant science Research**, n. 3, v. 2, p.4-5, 2001.

GIBBS, R.D.; **Chemotaxonomy of flowering plants**. Montreal: University Press. 1974. 1450p.

GORBE, E; CALATAYUD, A. Optimization of Nutrition in Soilless Systems: A Review. **Advances in Botanical Research**, v.53, p.193-230, 2010.

GONZALES-ESQUINCA, A. R. La Familia annonaceae Enchiapas y sus Metabolitos. **Ciencias y Tecnología en la Frontera**, n.3, p.41-52, 2005.

GUTIÉRREZ, D. et al. Involvement of nitrogen and cytokinins in photosynthetic acclimation to elevated CO₂ of spring wheat. **Journal of Plant Physiology**, v.170, p.1337-1343, 2013.

GUTSCHICK, V.P. Photosynthesis, Growth Rate, and Biomass Allocation In: JACKSON, L.E. (Ed.) **Ecology in agriculture**. Califórnia: Academic Press, 1997. p.39-78.

HABERMANN, G. **Trocas gasosas, relações hídricas e hormônios vegetais em laranjeirasdoce, infectadas por *Xylella fastidiosa*, em três regiões do Estado de São Paulo**. 2004. 167f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências de Botucatu Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2004.

HARLEY, P. C; SHARKEY, T. D. An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂: Reversed O₂ sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast. **Photosynthesis Research**, v. 27 p.169-178, 1991.

HARBONE, J. B.; **Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. London: Chapman and Hall, 2.ed. 1984. 288p.

HAWKESFORD, M. et al. Functions of Macronutrients. In: MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**, 3.ed, 2012. p.135-189.

HIGUCHI, H., SAKURATANI, T.; UTSUNOMIYA, N. Photosynthesis, leaf morphology and shoot growth as affected by temperatures in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) trees. **Scientia Horticulturae**, v.80, n.1-2, p.91-104, 1999.

HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes**. Sunderland: Sinauer Assoc., 1992. 607p.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water: culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32p.

HONG-WEI, L.; QI, Z.; ZHEN-SHENG, L. Variation in Photosynthetic Traits and Antioxidant Enzyme Activities in Wheat Seedlings Transferred from Low to High Light Growth Condition. **Acta Agronomica Sinica** v.36, n.3, p.449-456, 2010.

JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.43, p.1274-1279, 1971.

JESUS FILHO, J.D. **Hidroponia de plantas aromáticas, condimentares e medicinais**. São Paulo Vídeo Par, 27. 2000. (Manual Técnico).

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777p.

KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Pos-translation regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, v.363, n.52, p.1981-1989, 2001.

KAR. M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v.57, 315-319, 1976.

KAVATI, R. **A cultura de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.)**. Campinas: Cati, 1998. 22p.

KAVATI, R. Cultivo de atemoia. In: DONADIO, L.C.; MARTINS, A.B.G.; VALENTE, J.P. (Eds.) **Fruticultura tropical**. Jaboticabal: FUNEP, 1992 p. 39-70.

KAVATI, R. **Porta-enxertos em anonáceas**. In: FERREIRA, G. et al. (Eds.) **Anonáceas: Propagação e produção de mudas**. Botucatu: FEPAF, 2013. p. 111-123.

KESZEI, A. et al. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, v. 71, p. 844–852, (2010).

KIM, M. D. et al., Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants overexpressing the Cu Zn SOD, APX and NDPK2 genes. **Physiologia Plantarum**. v.140, n.2, p.153–162. 2010.

KIM, M.C. et al. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. **Molecular Plant**, v.2, n.1, p. 13-21, 2009.

KLAR, A.E. **A água no sistema solo-planta-atmosfera**, 2.ed. São Paulo:Nobel. 1984. 408p.

KROUK, G. et al. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. **Developmental Cell**, v.18, p.927– 937, 2010.

KOJIMA, N. TANAKA, T. Medical chemistry of Annonaceous acetogenins: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Analogues. **Molecules**, v.14, p.3621-3661, 2009.

LAMBERS, H. Does variation in photosynthetic rate explain variation in growth rate? **The Journal of Agricultural Science**, v.35, p.505-519, 1987.

LAMBERS, H. et al. Analysis of growth based on net assimilation rate and nitrogen productivity. Their physiological background. In: LAMBERS, H. et al., **Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants**. Netherlands: Hague, 1989. p.1-17.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F.S.; PONS, T.L. **Plant physiological ecology**. 2.ed. New York: Springer–Verlag, 2008. 640 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 2006. 529 p.

LAWLOR, D. W.; KONTTURI, M.; YOUNG A.T.. Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, p. 43–52, 1989.

LAWLOR, D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experiment Botany**, v.53, p.77, 2002.

LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J., LEEGOOD, R.C. **Plant biochemistry and molecular biology**. Chichester: John Wiley and Sons, 1993. p.155-180.

LEAL, F. P. **Desenvolvimento, produção e composição de óleo essencial da *mentha piperita* L., cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de nitrogênio**. 2001,155f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

LEBOUEF, M. et al.,The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, n.12 ,p.2783-2813, 1982.

LECOURIEUX, D. et al.Calcium in plant defence-signalling pathways. **New Phytologist**, v.171, p.249–269, 2006.

LEMOS, O.L. et al. Relação entre o metabolismo de nitrogênio e a fotossíntese na formação de frutos: uma revisão bibliográfica. **Diálogos & Ciência**, n.6, p.23-37, 2008.

LEITE, A. M. et al. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 43, p.121-125, 2007.

LIAN, C.C. et al. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p.4767-4776, 2005.

LIMA, L. A. R. S. et al. Antioxidant and cytotoxic potential of fatty acid methyl esters from the seeds of *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae) **Food Research International**, v. 48, p.873-875, 2012.

LOBÃO, A.Q.; ARAUJO, DOROTHY, S.D.de.; KURTZ, B.C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, **Rodriguésia**, v.56, n.87, p.85-96, 2005.

MAAS, P.J.M. et al. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v.52, n.80, p.65-98, 2001.

MAIRESSE, L.A.S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. 2005. 284f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 2005.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa de crescimento. In: FERRI, M.G. (Ed.) **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EDUSP, 1986. 350p.

MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa: UFV, 2005. 439p.

MARSCHNER, P. **Mineral nutrition of higher plants**. Australia: School of Agriculture, Food and Wine The University of Adelaide Australia, 3.ed., 2012, 651p.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E.. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, Imprensa universitária. p.22, 1995. *Apud*: de Moraes, L. A. S.. **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais**. Hortic. bras., v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Rom), 2009.

MARTINEZ, H. E. P.. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa**. Viçosa: UFV, 2002. 61p.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C. et al. Glutamine synthetase-glutamate synthase

pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. **Plant Physiology**, v.140, p.444–456, 2007.

MAY, A. et al. Produção de biomassa e óleo essencial de *Mentha citrata* em função do manejo cultural e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.5, n.3, p.370-375, 2010.

MCAINSH, M. R.; PITTMAN, J. K. Shaping the calcium signature. **The New Phytologist**. v.181, n.2, p.275–294, 2009.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition**. 5.ed. London: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.

MIELKE, M.S. et al. Some photosynthetic and growth responses of *Annona glabra* L. seedlings to soil flooding. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.4, p.905-911, 2005.

MIRALHA, J. M. S. **As Annonaceae da Reserva Florestal Ducke**. 1995. 165f. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Universidade Federal de Manaus (UFAM), Manaus, 1995.

MISHRA, B. B. et al. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**. v. 80, p. 81–90, 2009.

MISRA, N.; AJAY, K. G. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.11-18, 2006

MOHD KHALID, M.Z. Hybridizations between selected Annonaceae Species. **Acta Horticulturae**, v.575, n.2, p.367-369, 2002.

MOLLER, I.M. et al. A specific role for Ca^{2+} in the oxidation of exogenous NADH by Jerusalem-artichoke (*Helianthus tuberosus*) mitochondria. **Biochemistry**, v.194, p.487-495, 1981.

MORAN, N. Osmoregulation of leaf motor cells. **FEBS Letters**, v.581, p.2337–2347, 2007.

MORAWETZ, W.; HEMMER, W. Karyology. In: MAAS, P.J.M. (Ed.). **Flora Neotropica Monogr 57: Rollinia**. New York: The New York Botanical Garden, p.57-58, 1992.

NAGEGOWDA, D. A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS Letters**. v. 584, p. 2965–2973, 2010.

NEILL, S. et al. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.2, p.165–176, 2008.

NGIEFU, C.K. et al. Oil plants of Zaire II: Botanical families producing oils of medium insaturation. **Oleagineux**, v.31, p.545-547, 1976.

NUNES-NESI, A. et al. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**, v.3, n.6, p.973–996, 2010.

ODA, S. et al. Synthesis of (–)- β -caryophyllene oxide via regio- and stereoselective endocyclic epoxidation of β -caryophyllene with *Nemania aenea* SF 10099-1 in a liquid–liquid interface bioreactor (L–L IBR). **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 112 n. 6, 561–565, 2011

PEIXOTO, H.P.P. et al. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-143, 1999.

PELLINCER, M.C., RINCON, L., SAEZ, J. Las soluciones nutritivas. **Horto información**, v.3, p.39-43, 1995.

PETTERSSON, R.; MCDONALD, J. S. Effects of nitrogen supply on the acclimation of photosynthesis to elevated CO₂. **Photosynthesis Research**, v.39, p.389-400, 1994.

PEYRAT, J. F. et al. NMR Studies of Ca²⁺ Complexes of Annonaceous Acetogenins. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p.4811-4815, 1997.

PINTO, A.C.de.Q. et al. **Annonas Species**. Southampton: ICUC, 2005. 268p.

PINZÓN-TORRES, J.A.; SCHIAVINATO, M.A. Crescimento, eficiência fotossintética e eficiência do uso da água em quatro espécies de leguminosas arbóreas tropicais. **Hoehnea**, v.35, n.3, p.395-404, 2008.

RAI, V. et al. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. **Plant Science**, v.167, p.1159–1169, 2004.

RAINER H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): inclusion of the genus *Rollinia* A. St. Hil. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B Botanik und Zoologie** v.108, p.191–205, 2007.

RAMA DEVI, S.; PRASAD, M. N. V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, v. 138, n. 2, p. 157-165, 1998.

RASCHKE, K. Movements using turgor mechanisms. In: HAUPT, W.; FEINLEIB, M.E. (Eds.) **Physiology of Movements**. Berlin: Springer-verlag, 1979, p.383-441.

RUBIO-WILHELM, M. M. Effect of cytokinins on oxidative stress in tobacco plants under nitrogen deficiency. **Environmental and Experimental Botany**, v.72, p.167–173, 2011.

RUPRECHT, J.K. et al., Annonaceous Acetogenins a Review. **Journal of Natural Products**, v.53, p.237-248, 1990.

RÍO, M. I. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the essential oil from *Annona cherimola* (Annonaceae). **Revista de la Sociedad Química de México**, v.47, p. 139-142, 2003.

RODRIGUES, S.D. Análise de crescimento de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) submetidas a carências nutricionais. 1982. 176f. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1982.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar Flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v.55, p.567-573, 2000.

SANTOS, P. R. D. et al. Alkaloids from *Annona dióica*. Journal of the Brazilian. **Chemical Society**, v.14, n.3, p.369-400, 2003.

SAINT-HILAIRE, A. **Flora Brasiliae meridionalis**. Parisiis, 1825, 82p.

SCALOPPI JUNIOR, E.J. **Propagação de espécies de Annonaceae com estacas caulinares**. 2007. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SCHMITT, F.J. et al. Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1837, p.835-848, 2014.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v.42, p.558–566, 2013.

SEIGLER, D.S. Cyanogenic plants from Argentina. **Journal of natural Products**, v.42, n.2 p.179-182, 1979.

SHARKEY, T. D et al. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. **Plant, Cell and Environment**, v.30, p.1035-1040, 2007.

SHEN, T.C. et al. NADH- and NAD(P)H-Nitrate Reductases in Rice Seedlings. **Plant Physiology**. v.58, p. 292-294, 1976.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1305-1319, 2002.

SHIRATSUCHI, H.; YAMAGISHI, T.; ISHII, R. Leaf nitrogen distribution to maximize the canopy photosynthesis in rice. **Field Crops Research**, v.95, n.2-3, p. 291–304, 2006.

SILVA, F., CASALI, V.W.D. Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais. Viçosa: Arte Livros, 2000. 135p.

SILVA, L.C.; BELTERÃO, N.E.M.; NETO M.S.A. **Análise do Crescimento de Comunidades Vegetais**. Campina Grande: Embrapa, 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2004. 475p.

SIQUEIRA, C. A. T. et al. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and in vitro antiprotozoal activity. **Brazilian Journal of Pharmacognos.** v. 21, n.1, p. 33-40, 2011.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. (Ed.) **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.215-252, 2006.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 640p.

SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. **Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas**. Rio de Janeiro: Artware Projetos Culturais. 2002. 58p.

STITT, M. et al. Metabolic Networks: How to Identify Key Components in the Regulation of Metabolism and Growth. **Plant Physiology**, v.152, p.428–444, 2010.

SURVESWARAN, S. et al. Generic delimitation and historical biogeography in the early-divergent ‘ambavioid’ lineage of Annonaceae: *Cananga*, *Cyathocalyx* and *Drepananthus*. **Taxon**, v.59, p.1721–1734, 2010.

TABATABAEI, S. J. YUSEFI, M.; HAJILOO, J. Effects of shading and NO₃:NH₄ ratio on the yield, quality and N metabolism in strawberry. **Scientia Horticulturae**, v.116, p.264–272, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 819p.

TAKAHASHI, L.M. **Identificação de Colletotrichum gloeosporioides de atemoia (Annona cherimola x Annona squamosa), por meio de caracterização patogênica, cultural e morfológica**. 2008. 46f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

TAKEI, K. et al. AtIPT3 is a Key Determinant of Nitrate-Dependent Cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v.45, n.8, p.1053-1062, 2004.

TAN, W. et al. Photosynthesis is improved by exogenous calcium in heat-stressed tobacco plants. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.2063-2071, 2011.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*), **Plant Science**. v.153 p.65–72, 2000.

THANG, T.D et al. Study on the volatile oil contents of *Annona glabra* L., *Annona squamosa* L., *Annona muricata* L. and *Annona reticulata* L., from Vietnam. **Natural Product Research**, p.1–5, 2012.

TOKUNAGA, T. A. **Cultura da atemoia**. 2.ed. Campinas: CATI, 2005. 80p.

USDA, ARS, **National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN)** [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?455970>>. Acesso em: 12 ago. 2009.

UTSUNOMIYA, N.; HIGUCHI, H. Effects of Irradiance Level on the Growth and Photosynthesis of Cherimoya, Sugar Apple and Soursop Seedlings. **Environment Control in Biology**, v.34, n. 3, p. 201-207, 1996.

VALTER, J. L. et al. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18 n.3, p.373-378, 2008.

VEROMANN, E. et al. Effects of nitrogen fertilization on insect pests, their parasitoids, plant diseases and volatile organic compounds in *Brassica napus*. **Crop Protection**. v. 43, p.79 – 88, 2013.

VICKERS, C. E. et al. A unified mechanism of action for volatile isoprenoides in plant abiotic stress. **Nature chemical biology**. v. 5, n. 5, 2009.

VON CAEMMERER, S.; FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, v.153, n.4, p.376-387, 1981.

VON WIRÉN, N., GAZZARRINI, S., FROMMER, W.B. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. **Plant and Soil**, v.196, p.191-199, 1997.

WANG, L. Q. et al. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p. 561-565, 2002.

WEGER, H.G., TURPIN, D.H. Mitochondrial respiration can support NO₃ - and NO₂ - reduction during photosynthesis. **Plant Physiology**, v.89, p.409-415, 1989.

WHITE, P. J. Ion Transport. In: THOMAS, B. et al. (Eds.) **Encyclopaedia of Applied Plant Sciences**. London: Academic Press, 2003. p.625–634.

WONG, S.C.; COWAN, I.R.; FARQUHAR, G.D. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. **Nature**, v.282, p.424-26, 1979.

XAVIER, F.E. **Análise de crescimento de quatro cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), em duas épocas de plantio, em Viçosa, Minas Gerais**. 1976. 26f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1976.

YOA, Y. Q. et al. Anti-tumor effect of β -elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. **Cancer letters**, Amsterdam, v. 269, p.127-134, 2008.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5.ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice-Hall, 2010, 944 p.

ZENG, L.; Y.E. et al. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. **Natural Products Reports**, v.13, n.4, p.275-306, 1996.

ZHANG, S. et al. Temperature-Dependent Gas Exchange and Stomatal/Non-Stomatal Limitation to CO₂ Assimilation of *Quercus Liaotungensis* under Midday High Irradiance. **Photosynthetica**, v.39, n.3, p.383-388, 2001.

ZHAO, L. et al. Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v.82, p.497–530, 2013.

ZHOU, L. et al. Molecular phylogenetics of Uvaria (Annonaceae): relationships with Balongia, Dasoclema and Australian species of Melodorum. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.163, p.33–43, 2010.